



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**UTILIZAÇÃO DOS PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS EM
MEDICINA DENTÁRIA**

Trabalho submetido por
João Nuno Carmona de Brito Barreto
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Outubro de 2018



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**UTILIZAÇÃO DOS PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS EM
MEDICINA DENTÁRIA**

Trabalho submetido por
João Nuno Carmona de Brito Barreto
para a obtenção do grau de **Mestre** em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
Prof. Doutora Isabel Margarida Costa

e coorientado por
Mestre Carlos Família

Outubro de 2018

DEDICATÓRIA

*“O homem é do
tamanho do seu sonho”*

AGRADECIMENTOS

À Prof. Doutora Isabel Margarida Costa pela confiança e disponibilidade demonstrada.

Ao Mestre Carlos Família por toda a paciência e orientação. Quero agradecer-lhe toda a disponibilidade, a sua ajuda foi inigualável. Sei que não sou um aluno fácil, mas foi um prazer partilhar esta etapa consigo.

À minha família por sempre acreditar em mim. Mesmo sendo uma pessoa ausente, sempre me perceberam, apoiaram e incentivaram.

À Carlota Lopes, pela amizade, pela ajuda, e pela compreensão. Desculpa os atrasos, o mau feitio, e as faltas sem aviso. Obrigado por tudo parceira.

Ao Tiago Troles, Manuel Nobre e Filipa Raquel, que sempre me apelidaram de sortudo. Hoje percebo que sou um sortudo por ter amigos como vocês. Mesmo contra tudo, sempre acreditaram em mim. Obrigado pela amizade!

Ao Pipo, Roman, Fuso e Cardoso, toda a lealdade. Um obrigado pelas aventuras, e união. Um brinde à amizade, e que estejamos sempre como queremos!

Ao Filipe Magalhães, brother from another mother. Estamos juntos.

À Patrícia Pratas estas palavras nunca conseguirão ser suficientes. A amizade, a lealdade e a irmandade. Obrigado por tudo Pati, jamais esquecerei o que fizeste por mim, espero um dia conseguir devolver todo o carinho.

À Joana, à minha Joana que adoro. Obrigado por estares sempre presente, no mau feitio, no orgulho e na teimosia. Obrigado por seres quem és, e obrigado por estares sempre do meu lado. Adoro-te fofa.

À Iná e ao Manuel por toda a bondade e carinho que nunca vou conseguir retribuir. Pela permanente preocupação, disponibilidade e amizade. Obrigado pelos valores transmitidos, não seria quem sou se não fosse a vossa orientação. Especialmente a ti Iná, por tudo o que fizeste por mim.

Ao meu Pai por todo o sacrifício. Por sempre acreditar em mim e querer o meu melhor. Obrigado por me teres proporcionado este sonho.

Aos amigos da turma 2013-2018, esta conquista é nossa. A vida é dura para quem é mole!

RESUMO

Atualmente, a resistência bacteriana é considerada um importante problema de saúde pública, sendo assim imperativo a descoberta de novos medicamentos que consigam fazer face a estes microrganismos. Os péptidos antimicrobianos (AMPs) fazem parte do sistema imunitário inato, e caracterizam-se por possuir um largo espectro de ação contra bactérias, fungos, e vírus, sendo uma alternativa promissora aos antibióticos clássicos. Adicionalmente, o desenvolvimento de resistência por parte das bactérias a estes péptidos é significativamente inferior à dos antibióticos convencionais.

Em medicina dentária os AMPs têm demonstrado resultados promissores em áreas como a periodontologia, implantologia, endodontia, e principalmente em áreas de prevenção da formação de biofilmes, e de processos cariogénicos. Especificamente, β -defensinas, histatinas, hBD, HNP, e LL37, têm uma atividade antibacteriana versátil contra bactérias orais, tendo já respostas positivas e prometedoras a problemas até agora difíceis.

Esta monografia tem como objetivo de mostrar o potencial dos AMPs nestas áreas, e em uso clínico, bem como rever alguns dos seus mecanismos de ação e resistência.

Palavras-chave: péptidos antimicrobianos, medicina dentária, cárie, peri-implantite, endodontia

ABSTRACT

Currently, bacterial resistance is considered an important public health problem, so it is imperative to discover new drugs that can cope with these microorganisms. Antimicrobial peptides (AMPs) are part of the innate immune system, and are characterized by a broad spectrum of action against bacteria, fungi, and viruses, and are a promising alternative to classical antibiotics. In addition, the development of resistance by the bacteria to these peptides is significantly lower than that of conventional antibiotics.

In dental medicine, AMPs have shown promising results in areas such as periodontics, implantology, endodontics, and especially in areas of biofilm formation prevention and cariogenic processes. Specifically, β -defensins, histatins, hBD, HNP, and LL37, have versatile antibacterial activity against oral bacteria, already having positive and promising responses to hitherto difficult problems.

This monograph aims to show the potential of MPAs in these areas, and in clinical use, as well as to review some of their mechanisms of action and resistance.

Keywords: antimicrobial peptides, dentistry, caries, peri-implantitis, endodontics

ÍNDICE GERAL

I. INTRODUÇÃO	13
II. DESENVOLVIMENTO	17
II. 1 ANTIBIÓTICOS	17
II. 1.1 Considerações gerais.....	17
II. 1.2 Particularidades dos antibióticos em Medicina dentária.....	17
II. 1.3 Mecanismos de ação dos antibióticos	21
II. 1.4 Mecanismos de ação da resistência aos antibióticos.....	23
II. 1.5 Problema de saúde pública.....	25
II. 2 PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS	28
II. 2.1 Condições gerais	28
II. 2.2 Mecanismos de ação dos péptidos antimicrobianos	30
II. 2.3 Estrutura da célula bacteriana	32
II. 2.4 Propriedades físico-químicas importantes dos AMPs	33
II. 2.5 Estratégias para melhorar a eficácia dos AMPs.....	34
II. 2.6 Mecanismos de ação da resistência aos AMPs	36
II. 3 PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS EM MEDICINA DENTÁRIA	37
II. 3.1 Processos cariogênicos.....	39
Patogénese	39
Utilização de péptidos antimicrobianos como biomarcadores da cárie.....	41
II. 3.2 Periodontite	47
Patogénese	47
Tratamento atual	48
Utilização de péptidos antimicrobianos na periodontite	49
II. 3.3 Endodontia	51
Patogénese	51
Tratamento atual	53
Utilização de péptidos antimicrobianos no tratamento endodôntico.....	55
II. 3.4 Implantologia	58
Patogénese	59
Tratamento atual	60
Utilização de péptidos antimicrobianos na área da implantologia	61
III. CONCLUSÃO.....	63
IV. PERSPETIVAS FUTURAS.....	65
V. BIBLIOGRAFIA	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos de ação dos antibióticos. Adaptado de Galvão, 2013	21
Figura 2. Mecanismo de ação da resistência aos antibióticos. Adaptado de Penchovsky & Traykovska, 2015	24
Figura 3. Número de Aprovações Antibacterianas de Novos Medicamentos de 1980 até 2014. Adaptado de Ventola, 2015	26
Figura 4. Mecanismos de ação dos AMPs. Retirado de Sato & Feix, 2006.....	30
Figura 5. Estruturas envolvidas das células Gram-positivas e Gram-negativas. Adaptado de Galvão, 2013	32
Figura 6. Formação de placa bacteriana e cárie. Adaptado de Clínica Oral Concept, 2016	40
Figura 7. Ilustração da periodontite. Retirado de Centro Médico Dentário e Estético Integrado, 2017	48
Figura 8. Desenvolvimento da peri-implantite. Adaptado de Cabinet Dentaire du doctaire Goes P, 2016.....	59

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Fontes de AMPs e respectivos péptidos relacionados Adaptado de Moravej et al., 2018	14
Tabela 2. Comparação das propriedades gerais dos antibióticos e dos AMPs. Adaptado de Guilhelmelli et al., 2013 e Moravej et al., 2018	15
Tabela 3. Antibióticos convencionais usados nas infecções dentárias (O*- Administração oral, IV**- Administração intravenosa, IM*** - Administração intramuscular, UI – Unidade Internacional). Adaptado de Roda et al., 2007.....	19
Tabela 4. Lista de AMPs presentes na saliva. Retirado de Gorr, 2009	38
Tabela 5. Principais bactérias cariogénicas. Adaptado de Komatsuzawa et al., 2007 ...	41
Tabela 6. Bactérias periodontopatogénicas. Adaptado de Komatsuzawa et al., 2007 ...	47
Tabela 7. Micro-organismos isolados de canais radiculares com lesões apicais. Adaptado de Lima et al., 2015	55
Tabela 8. Lista de AMPs ativos contra micro-organismos presentes na microbiota endodôntica e a respetiva concentração mínima inibitória. Adaptado de Lima et al., 2015	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMP - Antimicrobial peptides

ABC - Adenosine triphosphate binding cassette

ADN - Ácido desoxirribonucleico

ATP - Adenosina trifosfato

CIM - Concentração inibitória mínima

MRSA - Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

DHPS – Enzima dexosi-hipusina sintase

PABA - Ácido-4-aminobenzoico

I. INTRODUÇÃO

A luta da humanidade contra doenças infecciosas é um facto bastante conhecido e a descoberta dos antibióticos veio permitir o seu controlo e prevenção. No entanto, estas continuam a ser a principal causa de morte no mundo, facto que se deve ao surgimento de novas doenças, reemergência de microrganismos antes controlados e, mais especificamente, pelo aparecimento da resistência antimicrobiana que, parece ser inevitável para quase todas os novos antibióticos (Garima Kapoor, Saurabh Saigal, 2017). Sendo atualmente reconhecido como um importante problema de saúde pública (OMS, 2018).

Os péptidos antimicrobianos (AMPs) estão entre os novos antibióticos e têm demonstrado potencial no combate a bactérias resistentes. São encontrados em todas as formas de vida, desde bactérias até plantas, vertebrados e invertebrados, exibindo propriedades antimicrobianas de amplo espectro, sendo eficazes contra uma grande variedade de bactérias, fungos, protozoários, vírus e células cancerígenas. Adicionalmente, estes péptidos têm mostrado também atividades imunomoduladoras, que são essenciais na imunorregulação adaptativa e na resposta inflamatória (Moravej et al., 2018).

Geralmente, os AMPs contribuem para a lise da bactéria e, causam principalmente perturbações estruturais ou funcionais das membranas celulares microbianas, ou inibem diretamente alvos intracelulares. Atualmente conhecem-se numerosos AMPs isolados de fontes naturais, como vertebrados e invertebrados (Tabela 1), assim como sintetizados em laboratório (Moravej et al., 2018).

Tabela 1. Fontes de AMPs e respetivos péptidos relacionados. Adaptado de Moravej et al., 2018

Fonte do AMP	AMP
Mamíferos	Defensina, Histatina, Indolicidina, Lactoferricina, LL-37, Protegrina
Anfíbios	Brevinina-20a, Distinctina, Japonicina-1 & 2, Maximina-1, Nigrosina 1 & 2, Pseudina-2, Temporina-1Od, Tigerina-1
Peixes	Pardaxinas, Pleurocidinas, Misgurinas, Parasina, Oncorricina II e III, Crisofsinas, HFIAP
Plantas	Lípidos de transferência de proteínas, Defensinas de plantas, Tioninas
Insetos	Abaecina, Alo3, Apidaecina IA, Atacinas, Cecropinas A, Coleopteracin, Defensina A, Dipterocina, Drosocina, Drosomicina, Formaecina, Galerimicina, Heliomicina, Lebocina, Melitina, Metchnikowin, Ponerocina G2, Roialisina, Sapecina, Sarotoxina (incluindo IA), smd1, Estomoxina, Tanatina, Termicina
Equinodermes	Beta-Timosina, Centrocina, Filamina A
Crustáceos	Arasina, Armadilidina, Astacidina 2, Calinectina, Crustina, Péptidos derivados de hemocianina, Penaidina, Scigonadina, Stilicina
Fungos	Aculeacina, Aureobasidina, <i>Echinocandina</i> FK463, Helioferina, Leucinostatina, Mulundocandina, Plectasina
Bactéria	Bacilomicina, Iturina, Nicomicina, Siringomcina, Siringostatina, Siringotoxina

Os AMPs têm mostrado possuir várias vantagens sobre os antibióticos convencionais (Tabela 2), tais como níveis mais baixos de resistência, atividade de amplo espectro, efeitos sinérgicos na atividade antimicrobiana de antibióticos e, mecanismos de morte rápida (Guilhelmelli et al., 2013). Estas propriedades levaram a que os AMPs fossem considerados os melhores candidatos para superar a resistência antibiótica (Moravej et al., 2018).

Tabela 2. Comparação das propriedades gerais dos antibióticos e dos AMPs. Adaptado de Guilhemelli et al., 2013 e Moravej et al., 2018

Propriedade	Antibióticos convencionais	AMPs
Espetro de atividade	Seletivos, atuam num ou dois microrganismos	Atividade de amplo espectro contra bactérias, fungos, alguns parasitas e vírus
Mecanismo de ação	Mecanismo específico, normalmente atuam num alvo ou numa classe de alvos (ex: enzimas especiais ou ribossoma), interage com as funções fisiológicas da bactéria	Nenhum mecanismo específico, geralmente baseia-se na sua estrutura e potência, que por sua vez facilita as interações e desestabilização da membrana, e a morte bacteriana
Atividade adicional	Não tem	Desempenham um papel crucial no recrutamento e promoção de elementos das respostas imunes inespecíficas
Toxicidade	Tende a ser seguro para células normais. Porém, em consumo a longo termo ou alta dosagem deve ser vigiado	Alguns problemas de toxicidade permanecem desconhecidos
Resistência	Geralmente surgem múltiplas resistências, causadas por mecanismos como variação, modificação química ou degradação de antibióticos	A resistência geralmente não pode acontecer diretamente, exceto os mecanismos como a membrana externa impermeável ou proteases específicas que podem ser derrotadas pela incorporação de D-aminoácidos ou alterações da coluna vertebral

II. DESENVOLVIMENTO

II. 1 ANTIBIÓTICOS

II. 1.1 Considerações gerais

A descoberta da penicilina por Sir Alexander Fleming em 1928 deu origem à era moderna dos antibióticos, tendo estes sido utilizados desde então para tratar infecções graves, salvando milhões de vidas. No entanto, pouco depois da sua introdução no mercado, o desenvolvimento de resistência à penicilina por parte de várias espécies bacterianas tornou-se um problema clínico substancial, colocando em causa muitos dos avanços nas décadas de 30 e 40. Os primeiros relatos destas resistências surgiram no Reino Unido em 1962, e nos Estados Unidos em 1968 com o aparecimento dos *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina. Mesmo a vancomicina, antibiótico introduzido na prática clínica em 1972 para contornar a resistência à meticilina, e ao qual se pensou que fosse extremamente difícil de desenvolver resistências, deu origem ao aparecimento de resistências em *Staphylococcus aureus* e estafilococos coagulase-negativos, em menos de 10 anos de prática clínica. Por isso, como estratégia para resolver este problema, a indústria farmacêutica focou-se no desenvolvimento de novos antibióticos durante as décadas de 60 a 80. No entanto, o fluxo de desenvolvimento de antibióticos começou a diminuir gradualmente ano após ano (Figura 3) (Ventola, 2015).

II. 1.2 Particularidades dos antibióticos em Medicina dentária

A medicina dentária é uma especialidade abrangente, dedicada a resolver infecções dentárias ou restaurar e reabilitar a estrutura dentária perdida por processos bacterianos. A utilização de antibióticos é assim uma parte integrante desta área. No entanto, o seu uso irracional pode levar a um aumento do risco de resistência pelas espécies bacterianas, aumentando, deste modo, os efeitos adversos e consequentemente os custos de tratamento (Ramamy A., 2014).

A cavidade oral é um ecossistema biológico extremamente complexo e apresenta uma grande diversidade de microrganismos, transitórios ou residentes, caracterizada por alguns autores como sendo composta por mais de 500 espécies diferentes. No entanto, a interação entre estes micro-organismos é complexa e a mudança de um estado de saúde para um estado de doença está normalmente associada a um desequilíbrio do ecossistema, especialmente no que diz respeito a doenças pulpares e periodontais. Ainda que apenas

alguns dos microrganismos causem infeções dentárias, no estado de doença, muitas das espécies bacterianas não patogénicas podem também contribuir para um ecossistema favorável à sobrevivência e crescimento de espécies patogénicas, principalmente quando estes se organizam em biofilmes. A compreensão deste princípio ecológico é de extrema importância no tratamento das infeções orais e dentárias, sabendo que microrganismos organizados em biofilme são mais resistentes à dosagem usual de antibióticos, em 1000 a 1500 vezes (Roda, Bagán, Bielsa, & Pastor, 2007; Ramasamy A., 2014).

Em medicina dentária, o tratamento de infeções encontra-se habitualmente dividido em três fases: diagnóstico, controlo de infeção e reabilitação/restauração. Com base no resultado do diagnóstico, o controlo da infeção envolve, por norma, a remoção de focos infecciosos e a resolução da infeção, o que inclui não só o uso de antibióticos/antissépticos, como a utilização de métodos cirúrgicos (Ramasamy A., 2014).

A maioria das dores dentárias são resultado do processo inflamatório induzido por uma infeção num compartimento fechado, como por exemplo a polpa e a região periodontal apical, ou em tecidos moles sensíveis e altamente inervados, como o espaço do periosteio, gengiva e periodonto. O controlo cirúrgico das infeções dentárias pode ser conseguido através da remoção mecânica da polpa infetada, bem como a drenagem do pus por incisão, quando existe envolvimento dos tecidos moles. Normalmente, é utilizada a combinação de uma ou mais técnicas. De facto, com medidas apropriadas para remover os focos de infeção, os antibióticos podem, no geral, não ser necessários (Ramasamy A., 2014).

A prescrição de antibióticos é na maioria dos casos empírica, tendo por base dados epidemiológicos clínicos e bacterianos, que permitem a identificação do conjunto de microrganismos mais prováveis de serem responsáveis pelo processo infeccioso. Como resultado, antibióticos de amplo espectro são quase sempre a escolha de primeira linha por parte dos médicos dentistas no tratamento das infeções bacterianas (Roda, Bagán, Bielsa, & Pastor, 2007), e por esta razão, uma gama muito limitada de medicamentos é normalmente usada estando alguns destes exemplificados na Tabela 3.

Tabela 3. Antibióticos convencionais usados nas infecções dentárias (O* - Administração oral, IV** - Administração intravenosa, IM*** - Administração intramuscular, UI – Unidade Internacional) - Adaptado de Roda et al., 2007

Fármaco	Via de administração	Posologia	Efeitos secundários
Amoxicilina	O*	500 mg/8 horas 1000 mg/12 horas	Diarreia, náuseas, hipersensibilidade
Amoxicilina – Ácido clavulânico	O / IV**	500-875 mg/8 horas* 2000 mg/12 horas* 1000-2000mg/8 horas**	Diarreia, náuseas, candidíase, hipersensibilidade
Clindamicina	O / IV	300 mg/8 horas* 600 mg/8 horas**	Colite pseudomembranosa
Azitromicina	O	500 mg/24 horas por 3 dias consecutivos	Problemas gastrointestinais
Ciprofloxacina	O	500 mg/12 horas	Problemas gastrointestinais
Metronidazol	O	500-750 mg/8 horas	Convulsões, anestesia ou parestesia dos membros, incompatível c/ ingestão de álcool
Gentamicina	IM*** / IV	240 mg/24 horas	Ototoxicidade, nefrotoxicidade
Penicilina	IM / IV	1.2-2.4 x10 ⁶ UI/24h*** Acima de 24x10 ⁶ UI/24h**	Hipersensibilidade, alterações gástricas

Na prática, os antibióticos são tipicamente prescritos para o tratamento de infecções dentárias agudas, infecções não dentárias, profilaxia contra infecção focal e local em pacientes com endocardite ou prótese valvular, e disseminação sistêmica em cirurgia oral. Ainda assim, a sensibilidade antibiótica das bactérias encontradas na cavidade oral está a diminuir gradualmente, e um número crescente de estirpes resistentes começam a ser

detetadas, particularmente em *Porphyromona* e *Prevotella*, assim como *Streptococcus viridans* (Roda et al., 2007).

A desvantagem do tratamento com antibióticos deve-se aos seus efeitos indesejáveis, como os distúrbios gástricos, hematológicos, neurológicos, dermatológicos e alérgicos, entre outros. No entanto, o desenvolvimento de resistências bacterianas é também de extrema importância, tanto para o doente individualmente como para a saúde pública em geral (Roda et al., 2007).

II. 1.3 Mecanismos de ação dos antibióticos

Os antibióticos podem ser bacteriostáticos, se inibirem o crescimento bacteriano, ou bactericidas, se induzirem a morte bacteriana. Podendo ter um espectro estreito, ou alargado (Penchovsky & Traykovska, 2015). No entanto são normalmente classificados com base no seu mecanismo de ação, existindo cinco mecanismos de ação principais (Figura 1): inibição da síntese da parede bacteriana, alteração da permeabilidade das membranas, modificação da síntese dos ácidos nucleicos, inibição da biossíntese proteica e de enzimas envolvidas no metabolismo celular (Guimarães S, Moura D, Silva PS, 2006; Leite, 2014).

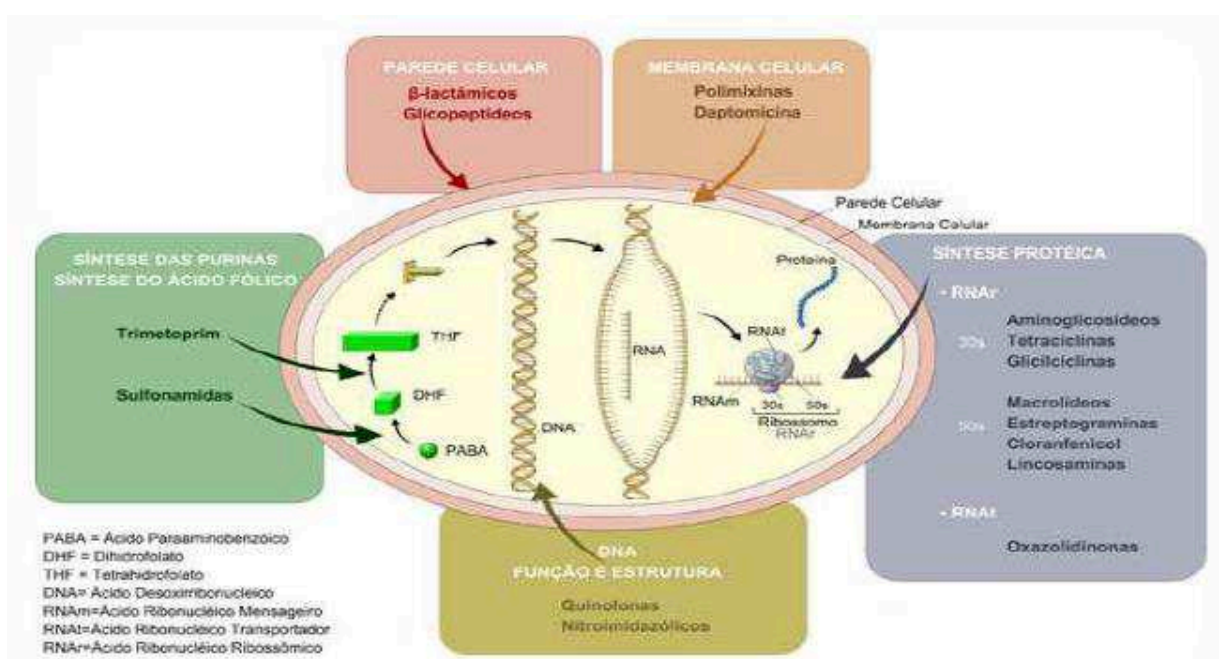


Figura 1. Mecanismos de ação dos antibióticos. Adaptado de Galvão, 2013

A inibição da síntese da parede bacteriana ocorre normalmente durante a fase de crescimento das bactérias, aquando a produção de nova parede celular (Guimarães S et al., 2006; Leite, 2014). Sendo o antibiótico eficaz *in vivo* apenas se se verificar uma diferença osmótica entre o organismo e o meio que promove a entrada de água para dentro da célula e consequente lise celular (Leite, 2014).

Neste grupo, estão incluídos a fosfomicina, a cicloserina, a bacitracina e os β -lactâmicos. Os antibióticos β -lactâmicos, por exemplo, levam à inibição irreversível das transpeptidases o que impede assim a formação de *cross-links* entre cadeiras proteicas

vizinhas durante a formação do peptidoglicano. A vancomicina forma complexos com o dipeptídeo D-alanil-D-alanina da cadeia peptídica dos precursores do peptidoglicano, inibindo também a sua formação.

Adicionalmente, os antibióticos com este mecanismo de ação são por norma seletivos, uma vez que não havendo parede celular nas células eucariotas, não ocorre qualquer alteração na atividade biológica das células humanas (Guimarães S et al., 2006; Leite, 2014).

Os antibióticos que alteram a permeabilidade da membrana citoplasmática, fazem-no ao dificultar o transporte de iões por parte da membrana ou ao alterar a permeabilidade e estrutura da membrana celular, levando a uma perda do equilíbrio osmótico (Guimarães S et al., 2006; Leite, 2014). Deste grupo, fazem parte os ionóforos, como a valinomicina e a gramidicina, assim como antibióticos polipeptídicos, como as polimixinas (Leite, 2014).

Os antibióticos que atuam pela modificação da síntese dos ácidos nucleicos, podem atuar sobre diversas fases da sua síntese, interferindo, desta forma, na expressão genética e por conseguinte na síntese proteica, divisão e multiplicação celular, levando a alterações estruturais na célula. Deste grupo, fazem parte as quinolonas, actinomicina D, os nitroimidazóis e as rifamicinas. Como exemplo, a fluoroquinolona do grupo das quinolonas atua ao inibir a DNA Girase e Topoisomerase IV, impedindo o desenrolamento da cadeia de DNA e a abertura da forquilha de replicação, respetivamente (Guimarães S et al., 2006; Leite, 2014).

Os antibióticos que atuam pela inibição da biossíntese proteica, atuam de uma forma geral diretamente sobre os ribossomas microbianos (Guimarães S et al., 2006; Leite, 2014). Os antibióticos disponíveis comercialmente que atuam desta forma são os macrólidos, as tetraciclina, os fenicóis e a clindamicina. Como exemplo a estreptomicina, um aminoglicosídeo, liga-se à proteína S12 da subunidade 30S dos ribossomas bacterianos, estabilizando irreversivelmente os ribossomas 70S e evitam assim a formação de complexos de iniciação ou levam à formação de proteínas *non-sense* (Guimarães S et al., 2006; Leite, 2014).

Os antibióticos que atuam através da inibição de enzimas envolvidas no metabolismo celular, denominam-se habitualmente de antimetabólicos. Estes atuam

normalmente como inibidores competitivos de enzimas chave de vias metabólicas essenciais ao ciclo de vida bacteriano, induzindo a sua morte. Neste grupo estão incluídas a trimetoprima e as sulfonamidas. A sulfadiazina é um exemplo de uma sulfonamida, análoga estrutural do PABA, que actua ao inibir de forma competitiva a di-hidropeteroato sintetase (DHPS) bacteriana, impedindo a incorporação do PABA no ácido di-hidropteroico e consequentemente a formação de ácido tetrahidrofólico, essencial à síntese de ácidos nucleicos e proteínas (Guimarães S. et al., 2006; Leite, 2014).

II. 1.4 Mecanismos de ação da resistência aos antibióticos

No contexto da resistência antimicrobiana, as bactérias apresentam três fenótipos fundamentais como suscetibilidade, resistência intrínseca e resistência adquirida (Mcdermott, Walker, & White, 2003).

A resistência intrínseca é natural a todos os membros de uma espécie e é um resultado da composição bioquímica do organismo selvagem, ou seja, acontece sem que ocorra uma exposição prévia ao antibiótico (Mcdermott, Walker, & White, 2003; Rice & Bonomo, 2005; Galvão, 2013). Por exemplo, as bactérias gram-negativas são intrinsecamente resistentes à atividade dos macrólidos porque esses agentes demoram a atravessar a parede celular e são simultaneamente expulsos pela atividade das bombas de efluxo. Alternativamente, uma bactéria pode não ter o alvo do medicamento. A resistência intrínseca restringe o espectro da atividade de um medicamento e contrasta com a resistência adquirida, que está presente em apenas alguns isolados de uma espécie (Mcdermott et al., 2003).

Existem quatro mecanismos principais que permitem a resistência das bactérias aos antibióticos (Figura 2), nomeadamente mecanismos enzimáticos que levam à inativação do antibiótico (A), modificação do alvo terapêutico (B), síntese de bombas de efluxos (C) e alteração da permeabilidade das membranas (D) (Penchovsky & Traykovska, 2015).

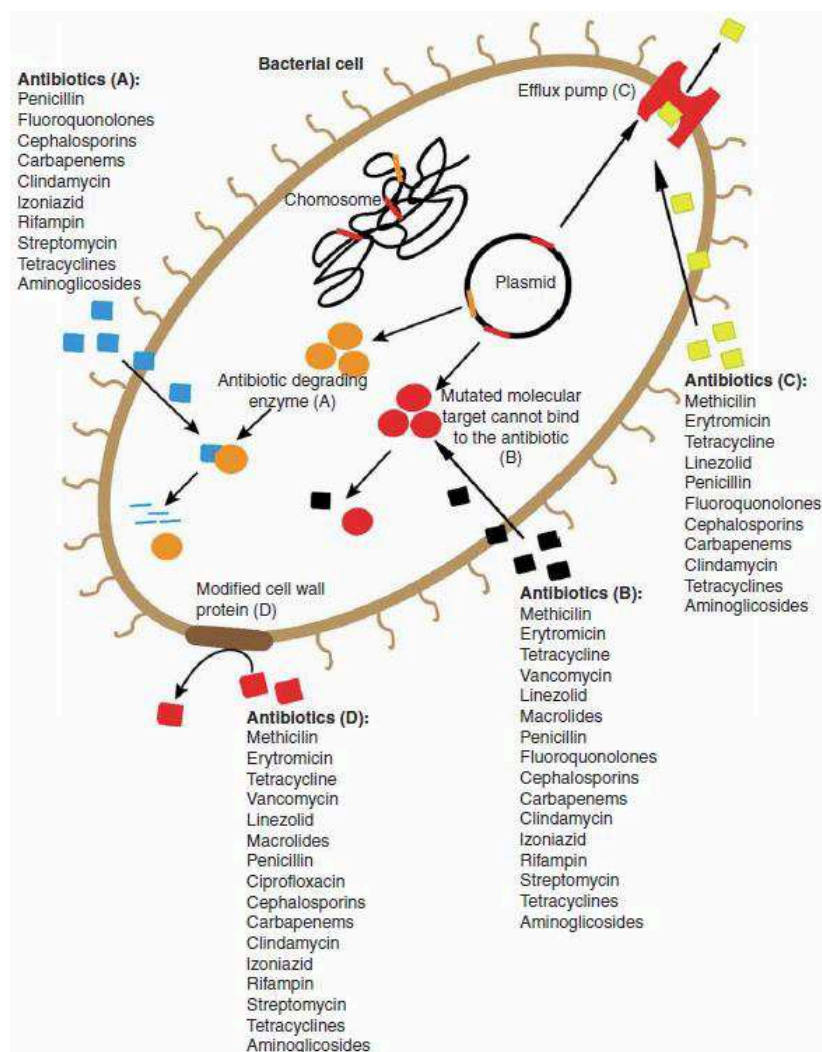


Figura 2. Mecanismo de ação da resistência aos antibióticos. Adaptado de Penchovsky & Traykovska, 2015

A ocorrência de mecanismos enzimáticos de resistência, devido à inativação dos fármacos, ocorre como consequência da produção de enzimas responsáveis pela degradação ou inativação do antibiótico, por parte da bactéria (Džidić, Šušković, & Kos, 2008; Galvão, 2013).

A modificação do alvo terapêutico consiste na diminuição ou eliminação da afinidade do antibiótico para o seu local de ligação, normalmente por mutação deste mesmo alvo terapêutico (Rice & Bonomo, 2005; Galvão, 2013).

As bombas de efluxo são proteínas que se encontram presentes na membrana externa bacteriana que facilitam o transporte ativo de antibióticos do meio intra para o extracelular (Džidić et al., 2008). Embora este mecanismo afete as várias classes de antibióticos, tem mostrado maior eficácia na eliminação de macrólitos, tetraciclina e fluoroquinolonas (Džidić et al., 2008; Galvão, 2013).

De uma forma geral, os antibióticos entram na célula bacteriana por três vias distintas, por difusão passiva através da bi-camada lipídica da membrana celular, por difusão através das porinas, e por *self promoted uptake*. Ainda assim, a entrada na célula bacteriana dependerá significativamente de características intrínsecas das moléculas do antibiótico. Sendo as porinas proteínas transmembranares expressas pela bactéria, e assim facilmente alteradas, a modificação da permeabilidade aos antibióticos ocorre normalmente por alterações estruturais, de número, da selectividade ou do tamanho das porinas (Džidić et al., 2008; Galvão, 2013).

II. 1.5 Problema de saúde pública

O uso excessivo de antibióticos levou claramente ao agravamento do desenvolvimento e dispersão das resistências, sendo que estudos epidemiológicos relacionaram o consumo de antibióticos e a disseminação de estirpes resistentes (Ventola, 2015).

De 1980 até 2014, assistiu-se a uma diminuição no número de aprovações para o desenvolvimento de novos antibióticos (Figura 3), talvez em parte devido à menor capacidade de explorar em termos económicos estes fármacos visto que existe um rápido desenvolvimento de resistências aos mesmos (Ventola, 2015).

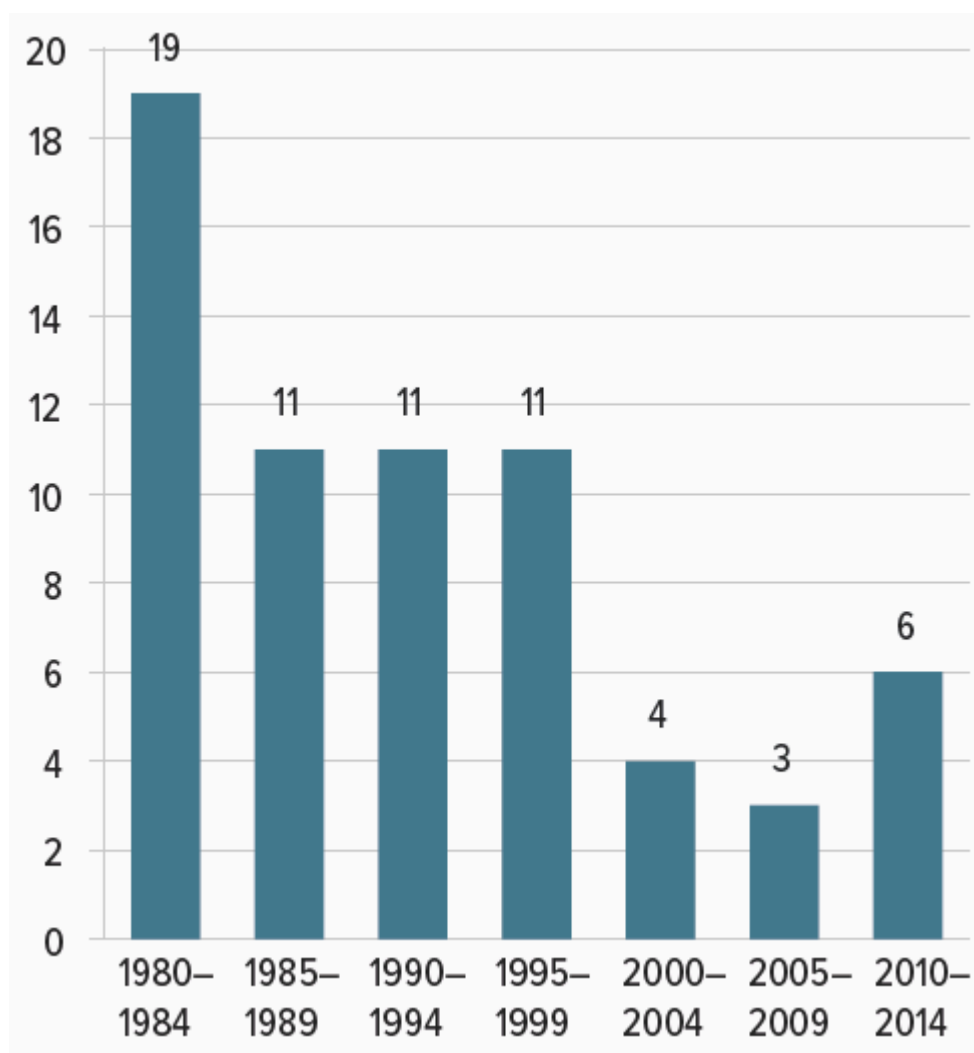


Figura 3. Número de Aprovações Antibacterianas de Novos Medicamentos de 1980 até 2014. Adaptado de Ventola, 2015

Porém, uma das razões deste fenómeno da resistência se desenvolver cada vez mais, prende-se pelo facto de, entre bactérias, os genes poderem ser herdados da bactéria mãe ou poderem ser adquiridos de não-familiares em elementos genéticos móveis, como plasmídeos. Esta transferência génica pode permitir a transferência de certas resistências a antibióticos entre diferentes espécies de bactérias. Não obstante, a resistência pode também ocorrer espontaneamente por meio de mutações (Ventola, 2015).

Em muitos países, os antibióticos não são regulamentados e estão disponíveis sem qualquer receita médica, de forma facilmente acessível, abundante e barata, o que promove a sua utilização abusiva. Adicionalmente, uma incorreta prescrição de antibióticos também vem contribuir para a promoção de bactérias resistentes. Vários estudos mostraram que a indicação do tratamento assim como a escolha do agente ou

duração da antibioterapia estão incorretas em 30% a 50% dos casos. Além disso, 30% a 60% dos antibióticos prescritos em unidades de terapia intensiva, foram considerados desnecessários ou inadequados. E ainda, concentrações sub-inibitórias e sub-terapêuticas promovem o desenvolvimento da resistência aos antibióticos, desenvolvendo alterações genéticas e aumentando a virulência (Ventola, 2015).

Estima-se ainda que 80% dos antibióticos vendidos nos EUA sejam usados em animais, para promover o crescimento e prevenir infecções e que, os antibióticos usados na pecuária, são ingeridos pelos seres humanos quando consomem este tipo de alimentos. Este facto da transferência de bactérias resistentes aos humanos, através dos animais de criação, foi observada pela primeira vez há mais de 35 anos, quando altas taxas de resistência a antibióticos foram encontradas na flora intestinal, tanto em animais como agricultores (Ventola, 2015).

II. 2 PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS

II. 2.1 Condições gerais

No final dos anos 1920, a lisozima foi descoberta por Alexander Fleming, tendo sido considerada, por alguns autores, como a primeira vez em que o termo AMP foi utilizado. Atualmente, sabe-se que a lisozima leva à lise da parede celular bacteriana (Moravej et al., 2018; Phoenix, Dennison, & Harris, 2013).

No entanto, a descoberta original dos AMPs ocorreu quando um agente antimicrobiano de *Bacillus spp.* foi encontrado em amostras de solo e, posteriormente, isolado, tendo apresentado capacidade de proteção contra a infeção pneumocócica em camundongos. A fração isolada foi denominada de gramicidina, sendo o primeiro AMP identificado. A gramicidina mostrou potencial no tratamento tópico de feridas e úlceras, porém, foi considerada tóxica após aplicação intraperitoneal. Mais tarde, em 1941, foi descoberta a tirocidina, eficaz contra bactérias gram-negativas e gram-positivas e que mostrou ser uma mistura de decapeptídeos cíclicos produzidos por *Bacillus brevis*. Ainda no mesmo ano, outro AMP foi isolado da planta *Triticum aestivum* e posteriormente denominado purotionina. Esta mostrou eficácia contra fungos e algumas bactérias patogénicas como *Pseudomonas solanacearum* e *Xanthomonas campestris* (Moravej et al., 2018; Phoenix et al., 2013).

Em 1956, foi isolado o primeiro AMP de origem animal a partir de leucócitos de coelho, a fagocitina, e nos anos seguintes, outros como bombinina, do sapo alaranjado, *bombina variegata* e lactoferrina do leite de vaca e, mais recentemente, foram identificados alguns AMPs nos lisossomas dos leucócitos humanos (Moravej et al., 2018).

Na década de 60, foram estudadas algumas moléculas antimicrobianas presentes na hemolinfa de larvas mariposa, quando infetadas com *Pseudomonas aeruginosa*. E, no final da década de 70, decorreram estudos que mencionaram proteínas antimicrobianas de leucócitos, incluindo os que hoje em dia são conhecidos como α -defensinas. Em 1981, foram injetadas em bactérias, presentes nas pupas da traça-da-seda, proteínas antimicrobianas catiónicas P9A e P9B. Da hemolinfa das pupas, conseguiu-se isolar *Hyalophora cecropia*, péptidos que foram caracterizados e renomeados como cecropinas, tendo sido relatados como os principais AMPs α -helicoidais. Em 1987, foram isoladas as magaininas, originalmente AMPs catiónicos de *Xenopus laevis*, caracterizadas como AMPs de defesa. Anos mais tarde, foram descobertas as β -defensinas e θ -defensinas, que diferem das α -defensinas nos seus pares de cisteína, após serem isoladas de granulócitos

e leucócitos bovinos, respetivamente, do macaco rhesus (Moravej et al., 2018; Phoenix et al., 2013).

Gradualmente, os AMPs foram considerados como tendo um papel defensivo nos organismos isentos de sistema imune inato e, em meados da década de 90, esse papel foi confirmado com a mosca da fruta *Drosophila melanogaster*, pois ao remover-se o gene que codifica os péptidos, este inseto tornou-se suscetível a uma infeção fúngica (Moravej et al., 2018; Phoenix et al., 2013).

Desde então, o papel destes péptidos tem sido extensivamente estudado em plantas, insetos e outros invertebrados, sem sistema imunológico adaptativo. Foi então constatado que os AMPs são produzidos pela maioria dos organismos multicelulares, incluindo os humanos, e comportam-se como um componente do sistema imunológico, sendo que foram identificados na maioria dos locais do corpo humano que são geralmente expostos a micróbios, como a pele e as mucosas (Moravej et al., 2018; Phoenix et al., 2013).

II. 2.2 Mecanismos de ação dos péptidos antimicrobianos

Os péptidos antimicrobianos desempenham a sua ação ao alterarem a permeabilidade da membrana celular e pela modulação do sistema adquirido (Guilhelmelli et al., 2013). Estes mecanismos, permitem que os AMPs possam ser agrupados em duas grandes famílias. O primeiro grupo corresponde às moléculas que atuam sobre a membrana citoplasmática, induzindo a sua permeabilização e, consequentemente a interrupção de seu normal funcionamento (Lee, N. Hall, & Aguilar, 2015). O segundo grupo corresponde a compostos cujos alvos de atuação são essencialmente intracelulares, nomeadamente ácidos nucleicos. Mesmo estando incluídos no segundo grupo, estes interagem com a membrana celular de forma a serem translocados para o compartimento intracelular. Assim, para além de membrana citoplasmática, os AMPs, a nível secundário, podem interagir com outros alvos intracelulares (Bernardino da Silva, 2017; Malanovic & Lohner, 2016).

A maioria dos AMPs possuem regiões polares e apolares, resultantes da segregação de resíduos com essas características, podendo-se ligar a constituintes hidrofóbicos e hidrofílicos das membranas bacterianas e induzindo assim alterações na sua estrutura e integridade (Bechinger & Gorr, 2017; Bernardino da Silva, 2017). A membrana celular é assim o primeiro alvo da ação de muitos AMPs, ao ligarem-se a lípidos membranares, particularmente, aos lípidos aniónicos (Bernardino da Silva, 2017; Malanovic & Lohner, 2016).

Na Figura 4 estão ilustrados os três modelos principais pelos quais os AMPs interagem com a bicamada fosfolipídica, referidos normalmente como modelo de tapete, poro em forma de barril e poro toroidal (Bernardino da Silva, 2017).

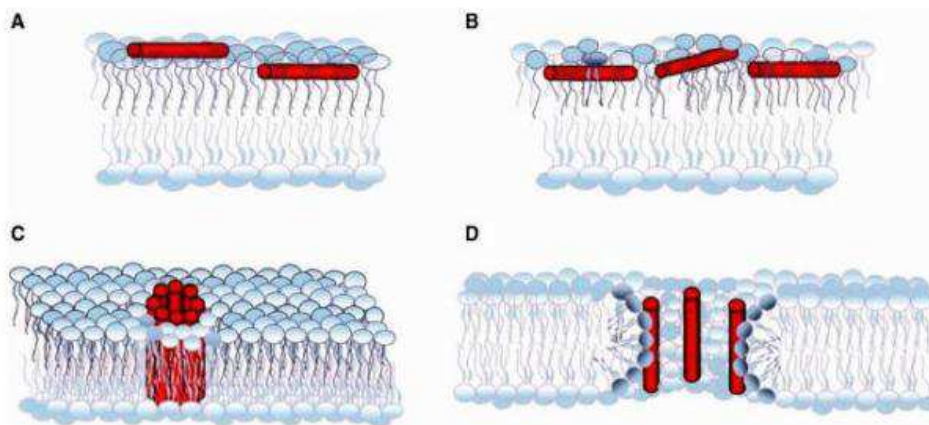


Figura 4. Mecanismos de ação dos AMPs. Retirado de Sato & Feix, 2006

O modelo de carpete (Figura 4A e 4B) foi descrito pela primeira vez para o péptido antimicrobiano denominado *S. dermaseptina*. Neste mecanismo, ocorrem interações iônicas entre os aminoácidos catiónicos dos péptidos e os grupos aniônicos da porção polar dos fosfolípidos da camada externa da membrana celular bacteriana. Em altas concentrações, os péptidos ligam-se orientados paralelamente, para a superfície da bicamada, o que se assemelha a uma “carpete”. Esta acumulação de moléculas peptídicas induz uma desintegração da membrana bacteriana ao alterar a curvatura da bicamada promovendo a formação de micelas (Cruz, Ortiz, Guzmán, Fernández-Lafuente, & Torres, 2014).

O modelo de poro em forma de barril (Figura 4C) envolve a formação de feixes de péptidos alfa-hélice anfipáticos que formam poros transmembranares, em que os seus resíduos hidrofílicos estão direcionados para o lúmen do poro. Estes poros estabelecem uma ligação dos monómeros peptídicos à membrana celular e, subsequentemente, são inseridos no núcleo lipídico da membrana celular bacteriana. De um modo geral, o número de monómeros para a formação de poros é dependente da concentração no péptido, sendo que quanto maior acumulação dos primeiros, maior será o tamanho do poro o que levará à libertação do conteúdo celular citoplasmático das bactérias para o meio extracelular (Cruz et al., 2014).

O modelo de poro toroidal (Figura 4D) ocorre em péptidos como as magaininas, protegrinas e melitinas, ocorrendo quando as faces polares dos péptidos estão associadas às porções polares das frações lipídicas. Os lípidos dispostos no poro são então inclinados a partir da estrutura lamelar normal e ligam as duas camadas da membrana, formando uma curvatura contínua de cima para baixo, na forma de um furo toroidal (Cruz et al., 2014).

Recentemente, foram descritos dois novos mecanismos de ação dos AMPs associados ao modelo poro toroidal. O primeiro é o modelo denominado "enorme poro toroidal", tendo sido estudado através da bacteriocina Lacticin Q, interagindo com lipossomas e bactérias. Neste modelo, propôs-se que a formação de poros é dada pela migração de moléculas de lacticina Q da membrana externa para a membrana interna. O segundo modelo é o "poro toroidal desordenado", que foi estudado usando dinâmica molecular com AMPs lineares. Inicialmente, o péptido adota uma estrutura cíclica, causando grandes distúrbios na bicamada lipídica, desenvolvendo um poro toroidal desordenado, que atinge um diâmetro médio de 1-2 nm (Cruz et al., 2014).

II. 2.3 Estrutura da célula bacteriana

As bactérias são normalmente divididas em dois grupos, Gram-positivas e as Gram-negativas (Figura 5), com base nas diferenças existentes no conjunto de estruturas que compõem o envelope externo à membrana citoplasmática (Garima Kapoor, Saurabh Saigal, 2017).

A membrana celular tem por função impedir a movimentação dos iões para dentro ou para fora da célula, mantendo os seus componentes citoplasmáticos e bacterianos num espaço definido. Esta membrana nas bactérias Gram-positivas é delimitada por uma parede celular, que consiste numa camada de peptidoglicanos que lhe dá a forma característica e que a protege estruturalmente contra stresses osmóticos e agressões mecânicas. Em contraste, as bactérias Gram-negativas apresentam uma parede celular fina, delimitada por uma segunda membrana lipídica chamada membrana externa que impede certas substâncias de penetrarem na célula bacteriana. Contudo, esta membrana possui canais denominados porinas, que permitem a entrada de várias moléculas, tais como os medicamentos (Garima Kapoor, Saurabh Saigal, 2017).

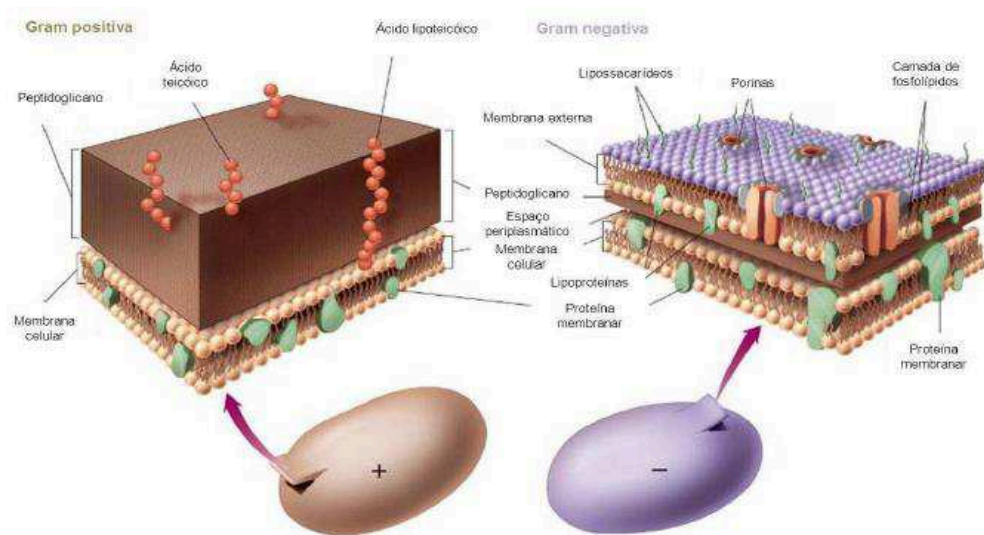


Figura 5. Estruturas envolventes das células Gram-positivas e Gram-negativas. Adaptado de Galvão, 2013

II. 2.4 Propriedades físico-químicas importantes dos AMPs

O comprimento de um AMP é fundamental para a sua atividade, uma vez que são necessários pelo menos 7-8 aminoácidos para formar estruturas anfipáticas, com extremidades hidrofóbicas e hidrofílicas, em lados opostos de uma molécula peptídica. Um AMP para atravessar a bicamada fosfolipídica bacteriana, no modelo poro de barril, deve possuir pelo menos 22 aminoácidos, para AMPs de α -helicoidal, enquanto que são necessários oito aminoácidos para os β -helicoidal. Além dos efeitos do comprimento na sua estrutura tridimensional e no seu modo de ação, o comprimento também pode afetar a sua citotoxicidade. AMPs curtos são menos tóxicos sendo crucial ter em consideração o seu comprimento ao serem projetados novos péptidos sintéticos com baixa toxicidade (Bahar & Ren, 2013).

A carga global de AMPs conhecidos, é a soma de todas as cargas de grupos ionizáveis do péptido, varia de negativa a positiva e é o principal fator para a interação inicial com membranas celulares negativamente carregadas. Ao existirem alterações nesta carga, as atividades antimicrobianas e hemolíticas podem sofrer alterações de modo a que a morte seletiva de micróbios seja alcançada, com ou sem minimização de efeitos nas células do hospedeiro (Bahar & Ren, 2013).

A helicidade representa a capacidade de um AMP para formar uma estrutura em *spin* e é importante para a determinação da toxicidade em células eucarióticas. A sua redução através da incorporação de D-aminoácidos na sequência primária, demonstrou diminuir o efeito hemolítico, enquanto que o efeito antimicrobiano é mantido. Esta, é uma estratégia útil para projetar novos péptidos sintéticos com menor atividade hemolítica e maior estabilidade contra clivagem proteolítica. Outro fator importante associado à helicidade do AMP é a propensão da hélice de cada aminoácido na sequência primária, por exemplo, a prolina e a glicina têm propensões de formação de hélice mais baixas em comparação com outros aminoácidos. Assim, não se verifica uma preferência a estes resíduos aquando da concessão de AMPs de α -helicoidal e, além disso, os péptidos devem ser flexíveis o suficiente para alterar sua conformação durante o processo de inserção da membrana (Bahar & Ren, 2013).

A hidrofobicidade também demonstrou influenciar a atividade e a seletividade de moléculas de AMP. Quase 50% dos aminoácidos, na sequência primária de AMPs naturais, são resíduos hidrofóbicos. Na maioria dos casos, o aumento da hidrofobicidade com carga positiva pode aumentar a sua atividade antimicrobiana, enquanto que a sua diminuição a pode reduzir. Deste modo, parece haver uma hidrofobicidade ótima para

cada AMP, além da qual a sua atividade diminui rapidamente. Portanto, ao desenhar novos péptidos sintéticos, a hidrofobicidade deve ser selecionada dentro de um limite restrito. Esta hidrofobicidade é essencial para determinar a faixa de células alvo de um AMP pois aumentar esta propriedade pode alterar o intervalo de alvos. Por exemplo, a magainina é um AMP que só é eficaz contra bactérias Gram-negativas, no entanto, alguns análogos sintéticos com maior hidrofobicidade também podem matar algumas bactérias Gram-positivas e células eucarióticas (Bahar & Ren, 2013).

A anfipaticidade é outra propriedade dos AMPs que garante a sua atividade e interação com as membranas microbianas. Esta propriedade é mais importante quando em comparação com a hidrofobicidade para existir uma ligação às membranas microbianas. Como a anfipaticidade dos AMPs é necessária para uma partição forte na interface da membrana, a prioridade deve ser dada à estrutura anfipática ao projetar AMPs sintéticos para células-alvo específicas (Bahar & Ren, 2013)

II. 2.5 Estratégias para melhorar a eficácia dos AMPs

Embora AMPs eucarióticos tenham sido identificados e caracterizados, muitos deles não chegaram a ser testados clinicamente e apenas alguns deles foram aprovados pela Food and Drug Administration (FDA). A maioria dos AMPs utilizados em ensaios clínicos são análogos de AMPs naturais, mas existem alguns que são completamente sintéticos (por exemplo, IMX942). A maioria dos AMPs são limitados a aplicações tópicas, devido à toxicidade sistêmica, à suscetibilidade dos péptidos à degradação de proteases e à sua rápida depuração renal. A administração oral de AMPs pode levar à digestão proteolítica por enzimas no trato digestivo, como tripsina e pepsina. Além disso, a administração sistêmica resulta numa curta meia vida *in vivo* e na degradação de proteases. Para contornar estas questões e melhorar a eficácia dos AMPs, podem ser usadas modificações químicas e mecanismos de veiculação (Kumar, Kizhakkedathu, & Straus, 2018).

Várias modificações químicas de AMPs têm sido utilizadas para melhorar a estabilidade dos péptidos contra a digestão proteolítica, incluindo o uso de D-aminoácidos, ciclização, acetilação e peptidomiméticos. A incorporação de D-aminoácidos não naturais nas sequências de AMP, tem como objetivo a inversão estereoquímica do péptido e, conseqüentemente, evitar a degradação das proteases, uma vez que as enzimas são estereoespecíficas (Kumar et al., 2018).

Outra estratégia importante para melhorar as propriedades dos AMPs é o uso de sistemas de veiculação, ou seja, sistemas que vão desde materiais inorgânicos a poliméricos, que podem ser usados para melhorar a estabilidade, toxicidade, meia-vida e perfil de liberação do péptido. Não obstante, os AMPs podem ser ligados covalentemente ao sistema de veiculação ou encapsulados de forma não covalente por estes diferentes tipos de sistemas (Kumar et al., 2018).

Muitos materiais inorgânicos, tais como partículas de sílica, titânio, nanopartículas metálicas (principalmente ouro e prata), pontos quânticos, grafeno e carbono têm sido utilizados para sistemas de veiculação de AMP. As nanopartículas podem ser obtidas através de vários materiais, porém, as de sílica têm sido amplamente utilizadas devido à sua capacidade de formar poros bem definidos para o transporte de AMPs. Outros materiais inorgânicos, por exemplo, nanotubos de óxido de grafeno, podem ser utilizados para ligar covalentemente AMPs, tais como nisina, usada para aumentar a actividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) (Kumar et al., 2018).

Lípidos e surfactantes podem formar uma vasta gama de estruturas, tais como micelas, lipossomas e microemulsões. Por exemplo, a encapsulação de LL-37 em lipossomas assegurou uma aumentada bioatividade e reduziu a sua toxicidade em culturas de células eucariotas. Além disso, emulsificadores antimicrobianos, como a monolaurina, podem ser usados para carregar AMPs, como a nisina Z, para formar estruturas nanomicelares que exibem atividade antimicrobiana sinérgica contra *Staphylococcus aureus* (Kumar et al., 2018).

Os materiais poliméricos podem também ser utilizados de diversas maneiras para o sistema de veiculação de AMPs, os quais incluem partículas, fibras, géis e multicamadas poliméricas e conjugados de polímeros. Alternativamente, os AMPs também podem ser conjugados com biopolímeros tais como quitosano e ácido hialurônico, que possuem múltiplos grupos funcionais para a ligação do péptido (Kumar et al., 2018).

II. 2.6 Mecanismos de ação da resistência aos AMPs

Os mecanismos de resistência intrínseca à ação dos AMPs desenvolvidos pelas bactérias podem ser passivos ou induzidos. A resistência passiva ocorre em algumas espécies bacterianas, incluindo *Proteus*, *Morganella*, *Providencia*, *Serratia* e *Burkholderia*, nas quais a presença de lípidos carregados positivamente reduz a interação dos AMPs com a membrana (Anaya-López, López-Meza, & Ochoa-Zarzosa, 2013; Andersson, Hughes, & Kubicek-Sutherland, 2016).

Um mecanismo comum de resistência é a incorporação de moléculas com carga positiva na superfície celular, com o intuito de reduzir a interação e ligação de AMPs catiónicos. A inativação destes mecanismos resulta numa maior suscetibilidade aos AMPs, incluindo componentes do sistema imune inato do hospedeiro e, muitas vezes, em virulência reduzida (Anaya-López et al., 2013; Andersson et al., 2016).

Nas bactérias Gram-negativas, a resistência intrínseca aos AMPs tem sido estudada em *Salmonella enterica* sorovar *Typhimurium*, na qual uma variedade de modificações nos lipopolissacarídeos é desencadeada por estímulos ambientais, incluindo fome nutricional, baixo pH, baixo teor de magnésio e alto teor de ferro, bem como vários tecidos do hospedeiro (Andersson et al., 2016).

Nas bactérias Gram-positivas, a resistência intrínseca aos AMPs ocorre após a incorporação de moléculas carregadas positivamente nos ácidos teicóicos da membrana celular, que desempenham um papel essencial na divisão celular, morfologia, adesão, virulência e resistência antimicrobiana. Embora prejudiciais para a função celular, as propriedades iónicas destes ácidos fazem deles um alvo para a ligação de AMPs carregados positivamente, uma vez que a resistência aos AMPs é frequentemente conferida por intermédio de modificações que reduzem a carga negativa da membrana bacteriana (Andersson et al., 2016).

II. 3 PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS EM MEDICINA DENTÁRIA

A pele e a mucosa são barreiras físicas ao ambiente externo, protegendo o hospedeiro de intrusos nocivos. No entanto, estas barreiras não são apenas físicas, uma vez que também são constituídas por péptidos antimicrobianos e anticorpos potentes (Weinbergl, 1998).

Os AMPs são conhecidos por terem um papel importante na defesa inata ou não adaptativa de um hospedeiro eucariótico, e exibem um amplo espectro de atividades microbidas, incluindo a flora natural associada ao hospedeiro. Em contraste com as impressionantes propriedades do sistema imunológico adquirido de alta especificidade e memória, a principal vantagem dos antibióticos peptídicos prende-se pela sua capacidade de rápido funcionamento contra múltiplas espécies bacterianas. Trabalhando em conjunto com o sistema imune adaptativo em mamíferos, o sistema imune inato permite ao hospedeiro conter o crescimento microbiano após uma infeção. Os péptidos antimicrobianos epiteliais têm a capacidade de manter a flora natural dos microrganismos num estado estacionário em diferentes localizações, como a pele, os intestinos, as vias aéreas, o canal endocervical e a cavidade oral (Weinbergl, 1998).

Os péptidos antimicrobianos catiónicos, produzidos pelas células epiteliais orais, desempenham um papel importante na determinação do resultado da interação patógeno-hospedeiro, na barreira mucosa oral. Por isso, os péptidos podem funcionar em conjunto com outras grandes proteínas antimicrobianas, caracterizadas pela sua permeabilidade aumentada associada a granulócitos leucocitários; péptidos antimicrobianos aniónicos, (calprotectina, associada a queratinócitos e granulócitos leucocitários) e péptidos antimicrobianos salivares, tais como as histatinas ricas em histidina. Estes péptidos têm um grande potencial na defesa do hospedeiro na cavidade oral, devido à sua grande especificidade podem encontrar uma utilização crescente nos tratamentos dentários futuros, tendo em conta o contínuo problema da resistência de múltiplos microrganismos orais aos antibióticos tradicionais (Weinbergl, 1998).

Atualmente, foram detetados mais de 40 AMPs endógenos à cavidade oral (Tabela 4) organizados em 6 categorias funcionais, com base nas suas características antimicrobianas (S.-U. Gorr, 2009; S. U. Gorr & Abdolhosseini, 2011).

Vários AMPs são encontrados na cavidade oral em concentrações abaixo da concentração inibitória mínima experimentalmente determinada, lançando alguma dúvida sobre a sua atividade antibacteriana (S. U. Gorr & Abdolhosseini, 2011). Por exemplo, as β -defensinas são encontradas na saliva em concentrações de ordem 1 a 2, de magnitude abaixo da concentração inibitória mínima para várias bactérias orais, como *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Streptococcus mutans* (Bechinger & Gorr, 2017; S. U. Gorr & Abdolhosseini, 2011).

Tabela 4. Lista de AMPs presentes na saliva. Retirado de Gorr, 2009

Adrenomedulina	Staterina	Beta-2-microglobulina	Cistatina C
HNP-1	CCL 28	Prolina- rica em proteínas	Cistatina D
HNP-2	Azurocidina/ CAP 37/ proteína obrigatória da heparina	Fibronectina	Cistatina S
HNP-3	Substâncias P	Calgranulina A	Cistatina SA
hBD-1	Péptido relacionado com o gene da Calcitonina	Calgranulina B	Cistatina SN
hBD-2	Neuropéptido Y	Psoriasina	Inibidor da protéase secretora leucocitária
hBD-3	Péptido intestinal vasoativo	Lactoferrina	SKALP/ ELAFINA
Catelicidina/LL 37	Mucina 7	Cistatina A	Lactoperoxidase
Histatina 1	GP340/ aglutinina salivar/ DMBT1	Cistatina B	Mieloperoxidase
Histatina 3	Proteína surfactantina A	Cistatina C	Lisozima C

Alguns dos AMPs da saliva foram testados e mostraram-se eficazes contra bactérias patogênicas da cavidade oral. Foram demonstradas interações sinérgicas em alguns AMPs, que poderiam restaurar a atividade mesmo estando abaixo da concentração inibitória mínima dos componentes individuais (Gorr & Abdolhosseini, 2011). Apesar da abundância de AMPs, o ambiente oral permite o crescimento de bactérias orais, que rapidamente formam biofilmes na ausência de higiene oral. Inversamente, as bactérias invasoras raramente causam infecções, mesmo no caso de feridas orais ou extrações dentárias e, deste modo, é do conhecimento geral que o crescimento de bactérias encontradas no ar e na água é inibido pela saliva, enquanto que as bactérias orais são relativamente resistentes à saliva (Bechinger & Gorr, 2017).

II. 3.1 Processos cariogênicos

A cárie dentária é uma doença oral multifatorial de origem bacteriana e é considerado um problema de saúde global crescente e dispendioso (Pepperney & Chikindas, 2011). Recentemente tem sido associada ao desenvolvimento de doenças sistêmicas, como doenças cardiovasculares, endocardite e pneumonia. Trata-se de um processo dinâmico em que a sua iniciação consiste na formação de biofilmes bacterianos (placa dentária) na superfície dentária, resultando na perturbação do equilíbrio entre a componente mineral do dente e o fluído da placa circundante, resultando numa perda da componente mineral ao longo do tempo por dissolução, produzindo assim uma lesão superficial. Esta desmineralização do esmalte pode levar a um colapso da sua superfície sobre a lesão e, uma vez atingindo este estadio da doença, deve-se intervir, removendo a lesão e restaurando o dente, limitando assim a disseminação da cárie e a sua eventual perda. (Dashper, Liu, & Reynolds, 2007; Ding et al., 2014; Komatsuzawa et al., 2007).

Patogénese

Na origem da cárie estão presentes biofilmes bacterianos, em que a sua proliferação se traduz em vantagens para o crescimento bacteriano. Em biofilmes polimicrobianos, está descrito que as atividades metabólicas podem ser integradas estando presentes uma variedade de espécies o que favorece uma maior flexibilidade nas atividades metabólicas e catabólicas (Cvitkovitch, Li, & Ellen, 2003; Dashper et al., 2007; Palmer, Gordon, Cisar, & Kolenbrander, 2003).

Segundo o Centro de Controle e Prevenção de Doenças estima-se que em 65% das infecções bacterianas humanas existe a presença de um biofilme. Estes dificultam o tratamento de infecções crónicas, uma vez que oferecem proteção às bactérias contra sistema imunológico, havendo diminuição da eficácia antibiótica e dispersando as células livres para locais distantes, o que pode promover a reinfeção. A placa bacteriana presente nas superfícies dentárias é um exemplo clássico de biofilme bacteriano, onde a alta diversidade de espécies forma um biofilme polimicrobiano que cresce na superfície do dente (Figura 6) (Cvitkovitch et al., 2003; Dashper et al., 2007; Palmer et al., 2003).



Figura 6. Formação de placa bacteriana e cárie. Adaptado de Clínica Oral concept, 2016

Os microrganismos que têm uma maior capacidade de adesão e que colonizam precocemente as superfícies dentárias, são: *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus gordonii* e *Actinomyces spp.* Sendo que as principais espécies bacterianas associadas ao desenvolvimento inicial da cárie pertencem ao grupo *Streptococcus mutans* (Tabela 5), concretamente, *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*, bactérias Gram-positivas, fortemente acidogénicas. Estas espécies fazem parte da microflora oral normal e são consideradas patógenos oportunistas. Em particular, o *S. mutans*, ativamente envolvido na formação de biofilmes, é considerado o mais importante patógeno causador da cárie dentária, expressa glicosiltransferases que sintetizam glucanos extracelulares, que são essenciais para adesão celular dependente de sacarose e formação de biofilme. Assim, o controlo efetivo de *S. mutans* e de bactérias associadas aos biofilmes orais é a chave para a prevenção e tratamento da cárie dentária. Nesta área, o flúor tem sido o principal meio na prevenção (Dashper et al., 2007; Ding et al., 2014; Komatsuzawa et al., 2007).

Tabela 5. Principais bactérias cariogênicas. Adaptado de Komatsuzawa et al., 2007

Espécie	Gram	Morfologia	Anaeróbio	Atividade Cariogénica
<i>S. mutans</i>	positiva	Cocos	facultativo	+++
<i>S. sobrinus</i>	positiva	Cocos	facultativo	+++
<i>S. sanguinis</i>	positiva	Cocos	facultativo	+
<i>S. Salivarius</i>	positiva	Cocos	facultativo	+
<i>S. mitis</i>	positiva	Cocos	facultativo	+
<i>Actinomyces spp.</i>	positiva	Bacilos	facultativo	+
<i>Lactobacillus spp.</i>	positiva	Bacilos	facultativo	+

O epitélio da mucosa oral é uma barreira física contra os microrganismos patogênicos do hospedeiro, epitélio este que recobre os tecidos da cavidade oral, incluindo a língua, mucosa oral e faríngea, e gengivas. Porém, como existe uma capacidade de sobrevivência das bactérias no meio oral, considera-se que existe um balanço entre o sistema de defesa do hospedeiro e o mecanismo de resistência bacteriano das mesmas (Dashper et al., 2007; Ding et al., 2014; Komatsuzawa et al., 2007).

Utilização de péptidos antimicrobianos como biomarcadores da cárie

A previsão do risco de cárie é de relevante importância e interesse para o desenvolvimento de novas estratégias preventivas contra a cárie. Sendo especialmente significativo em crianças pequenas e em crianças com necessidades especiais. A saliva é um fluido facilmente coletado e de forma não invasiva, usado para medir e monitorar o risco de cárie. O ensaio para o HNP1-3 é fácil de execução e pode ser feito com menos de 0,5 ml de saliva total. Ainda não é possível determinar se o nível de α -defensina salivar é preditivo de futuras cáries, porém tem sido demonstrado que crianças com cárie têm um valor médio significativamente menor de α -defensinas com base no volume de saliva em relação à concentração de proteína salivar total. Assim, baixos níveis salivares de α -defensinas podem ser uma medida inovadora e útil no risco de cárie em crianças. Estudos futuros podem levar ao desenvolvimento de meios de forma a aumentar a expressão peptídica oral endógena, a utilização desses péptidos como terapêutica e para um teste simples de avaliação clínica do risco de cárie. (Tao et al., 2005)

Crianças com altos níveis de cáries não apresentam níveis elevados de *S. mutans* salivares não havendo correlação com níveis de HNP1-3 (alfa-defensinas). Enquanto os níveis de LL37 e hBD-3 (beta-defensina 3 humana) não se correlacionaram com a experiência de cárie e os níveis medianos de HNP1-3 foram significativamente maiores em crianças sem cárie quando em comparação com crianças com cárie. Baixos níveis salivares de HNP1-3 podem representar um fator biológico que contribui para a suscetibilidade à cárie. Esta observação poderia levar a novas formas de rastrear a suscetibilidade e a novos meios de avaliar o risco para este problema oral comum (Tao et al., 2005).

Os níveis de AMPs encontrados na saliva estão na faixa de função antimicrobiana efetiva, especialmente considerando a baixa concentração de sal na saliva e a ação sinérgica dos péptidos (Maisetta et al., 2003). Assim, a correlação de um AMP catiónico salivar com experiência de cárie sugere o possível efeito protetor do HNP1-3. Por outro lado, baixos níveis de HNP1-3 podem resultar em aumento da suscetibilidade à cárie (Tao et al., 2005).

Existem controvérsias quanto à relação entre as concentrações de péptidos antimicrobianos e a presença de cárie dentária em crianças. Através dos níveis de AMPs na saliva de crianças livres de cárie, cárie precoce e cárie precoce da infância, determinou-se que os níveis de péptidos salivares individualmente ou quando em combinação foram relacionados com a gravidade da cárie e os níveis de estreptococos do grupo *mutans*. Há correlações positivas entre hBD-2 e HTN-5 com níveis de estreptococos do grupo *mutans* salivares e entre as concentrações salivares de AMPs (HNP1-3 e LL-37) em crianças de 3 anos de idade. Em contraste, não foi encontrada uma correlação entre os níveis de estreptococos LL-37 e *mutans*. Outra associação foi observada entre os níveis de hBD-2 e LL-37 e a extensão da cárie, o que não foi encontrado para HTN-5 e hBD-3. Estes resultados sugerem que o sistema imune inato de crianças, representado por péptidos antimicrobianos, reage à presença de *S. mutans* e a sua produção é aumentada na presença de cárie dentária. Correlações positivas entre hBD-2, hBD-3, LL-37 e HTN-5 (exceto pela combinação de HTN-5 e hBD-3) são observadas, sugerindo que pode haver uma ação combinada desses péptidos na resposta do hospedeiro possivelmente a patógenos de cárie, uma vez que as crianças estudadas eram saudáveis, exceto por apresentar cáries dentárias (Colombo et al., 2016).

As bactérias patogénicas e cariogénicas do periodonto apresentam suscetibilidade aos principais péptidos antimicrobianos produzidos pelos epitélios. Embora os péptidos

tenham atividade bactericida contra a maior parte das bactérias, é constatado que essa atividade é variável contra as diferentes estirpes bem como diferentes espécies. Concluiu-se então que β -defensinas e LL37 têm uma atividade antibacteriana versátil contra bactérias orais (Ouhara, Komatsuzawa, & Yamada, 2005).

Segundo Komatsuzawa as bactérias gram-positivas, principalmente *S. mutans* e *S. sobrinus*, provocam cárie dentária, enquanto a periodontite é causada por bactérias Gram-negativas, incluindo *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* entre outros. Juntamente com outras bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, estas bactérias em particular estão presentes principalmente na placa dentária e formam um biofilme de forma a evitar o ataque do sistema imune do hospedeiro ou dos reagentes antibacterianos. Recentemente, a cárie dentária e a periodontite foram precursores implicados para o desenvolvimento de doenças sistêmicas, como doença cardiovascular, endocardite e pneumonia (X. Li, Kolltveit, Tronstad, & Olsen, 2000). Portanto, uma boa saúde local ou sistêmica está significativamente correlacionada ao controle de doenças orais (Komatsuzawa et al., 2007).

Os péptidos antimicrobianos presentes na cavidade oral têm mostrado atividade bactericida contra bactérias periodontopatogênicas e cariogênicas. Porém, esses péptidos têm potencial para uso em aplicações clínicas. Além disso, é importante notar que a suscetibilidade a esses péptidos é altamente variável entre espécies e/ou estirpes de bactérias, implicando que a suscetibilidade a péptidos antimicrobianos é uma das principais características no controle da interação parasita-hospedeiro. No entanto, poucos dados estão disponíveis no que diz respeito à suscetibilidade bacteriana oral a péptidos antimicrobianos, especialmente no contexto do ambiente fisiológico da cavidade oral (Komatsuzawa et al., 2007).

Uma tendência para níveis mais baixos de *Streptococcus mutans* salivares em crianças com cárie é elevada, o que pode ser um reflexo do aumento da aderência das bactérias à superfície dentária, ou devido à presença de estirpes mais aderentes e/ou mais cariogênicas (Rudney & Staikov, 2002). Acredita-se que muitos componentes proteicos salivares, como a glicoproteína rica em prolina, mucinas, imunoglobulinas, aglutinina, lactoferrina, cistatinas e lisozima, tenham um papel na defesa na cavidade oral (Van Nieuw Amerongen, Bolscher, & Veerman, 2004).

Utilização dos péptidos antimicrobianos no tratamento de processos cariogénicos

O AMP Bac8c e alguns dos seus derivados foi avaliado contra bactérias associadas à cárie dentária, sendo que o modo de ação de Bac8c em bactérias Gram-negativas como a *E. coli*, envolve a interferência com múltiplos alvos, como interação direta com a membrana, depleção de ATP e desequilíbrio redox. Em concentrações subletais, o tratamento com Bac8c inibiu a translação, mas não se obteve um efeito sobre o crescimento celular. Em concentrações letais, o tratamento com Bac8c despolarizou rapidamente a membrana, inibindo rapidamente toda a síntese macromolecular e finalmente levou à morte celular (Spindler, Hale, Giddings, Hancock, & Gill, 2011). Contudo, o modo de ação de Bac8c em bactérias Gram-positivas ainda não está claro. Os poros transmembranares e a rutura da membrana causados pelo tratamento com Bac8c podem eventualmente levar à lise das células bacterianas, especulando-se assim que a membrana citoplasmática de bactérias Gram-positivas poderá ser um dos alvos críticos de Bac8c. Tem sido relatado que as células bacterianas em diferentes fases de crescimento têm suscetibilidade diferente ao péptido catiónico, adicionalmente a duração de vida útil pode ser de 2-5 min, sendo portanto muito promissor para ser usado na clínica ou na vida diária como forma de prevenção contra a cárie dentária. Além disso, os resultados citotóxicos indicaram que o tratamento com Bac8c por um curto espaço de tempo não causam citotoxicidade óbvia nos fibroblastos gengivais humanos (Ding et al., 2014).

Uma abordagem de baixo custo usando péptidos antimicrobianos de origem vegetal (PMAMPs) em uso tópico para controlo de biofilmes foi investigada. Os PMAMP mataram rapidamente o patógeno *Streptococcus mutans* e prejudicaram a formação de biofilme após uma única aplicação tópica. Desenvolveu-se uma abordagem sinérgica usando PMAMPs combinados com enzimas degradadoras de matriz para facilitar o acesso aos biofilmes e matar as bactérias incorporadas. Além disso, identificou um novo papel para PMAMPs na veiculação de fármacos para as células periodontais e gengivais, 13 e 48 vezes mais eficientemente do que qualquer outro péptido de penetração celular testado. Portanto, os péptidos fundidos com a protegrina expressa em células vegetais poderiam potencialmente desempenhar um papel duplo no fornecimento de proteínas terapêuticas aos tecidos das gengivas, enquanto matam as bactérias patogênicas quando administradas como fórmulas tópicos orais ou pastilhas. Aprovação recente do FDA (Food and Drug Administration) de péptidos produzidos por plantas é um bom augúrio para o avanço clínico deste novo conceito (Liu et al., 2016).

Além da rutura do biofilme, o aumento da cicatrização de feridas nos tecidos das gengivais é uma necessidade clínica importante. Tanto a protocina como a retrociclina podem entrar nos mastócitos humanos e induzir a desgranulação, um passo importante no processo de cicatrização de feridas (Gupta, Kotian, Subramanian, Daniell, & Ali, 2015). Portanto, os péptidos antimicrobianos protegrina e retrociclina podem desempenhar um papel importante na eliminação de bactérias em biofilmes e iniciar a cicatrização de feridas por meio da desgranulação de mastócitos. Além disso, é importante administrar efetivamente hormonas de crescimento ou outras proteínas bioativas para aumentar a adesão celular, estimular a osteogênese e diferenciar os osteoblastos ou células endoteliais. Devido à fácil libertação proporciona uma alternativa às atuais formulações orais de enxaguamento, isto é, curta duração do contato dos antimicrobianos na gengiva/superfície dentária. No entanto, são necessários mais estudos in vivo e clínicos para avaliar a eficácia anti-biofilme / anticárie, bem como a administração sustentada e dirigida de fármacos na cavidade oral (Liu et al., 2016).

Resumindo, além da aplicação tópica, os fármacos proteicos fundidos com a protegrina expressa em células vegetais têm o potencial de ser administrados por via oral aos tecidos da gengiva de maneira não invasiva e aumentar a adesão do paciente. O alto custo dos atuais fármacos proteicos é devido à sua produção em fermentadores proibitivamente caros, purificação, transporte / armazenamento a frio, vida útil curta e métodos de veiculação estéreis. Todos esses desafios poderiam ser eliminados usando este novo conceito de administração de drogas para prevenir infeções relacionadas a biofilmes e melhorar a saúde oral (Liu et al., 2016).

O péptido ZXR-2 apresenta também uma atividade potente contra bactérias patogénicas da cárie dentária, como *S. mutans*, *S. sobrinus* e *P. gingivalis*. No entanto, a sua atividade contra estirpes probióticas, incluindo *L. rhamnosus* e *L. paracasei*, foram relativamente baixas, ou seja, o ZXR-2 preveniu a formação de biofilmes de *S. mutans*, mas teve um efeito limitado em biofilmes maduros. A atividade seletiva, potente e rápida de ZXR-2 faz com que seja um potencial agente terapêutico para a prevenção e tratamento da cárie dentária. Apesar dos bons resultados, antes de uso clínico, mais estudos são necessários para melhorar a sua capacidade de eliminação do biofilme e reduzir ainda mais a sua citotoxicidade (L. Chen et al., 2017).

Os AMPs GH8, GH12, e GH16 mostraram a capacidade de inibir bactérias e biofilmes planctónicos. Os objetivos principais consistem na síntese de uma série de AMPs α -helicoidais, catiónicos, anfipáticos, que seriam mais curtos, menos citotóxicos e

mais potentes do que os AMPs existentes contra bactérias cariogénicas. Dos três, o GH12 apresentou os parâmetros estruturais mais equilibrados e um conteúdo da estrutura α -helicoidal. Segundo (Y. Wang et al., 2017) o GH12 causou lise celular e formação de poros em citomembranas, sugerindo que o GH12 provavelmente funcionará através do mecanismo atualmente aceite de atividade antimicrobiana de AMPs α -helicoidais anfipáticos (Melo, Ferre, & Castanho, 2009). Este mecanismo envolve dois passos. Primeiro, os péptidos acumulam-se na membrana das bactérias por meio de interações eletrostáticas com os grupos carregados negativamente na superfície da célula. Em segundo lugar, as porções hidrofóbicas de AMPs inserem-se em bicamadas lipídicas, para mediar ruturas de membranas através do poro de bastão, poro toroidal, poro toroidal desordenado e/ou mecanismos de tapete. Isso resulta em despolarização, vazamento de metabólitos essenciais e perda de composição específica da membrana. Com base neste mecanismo de ação, os péptidos α -helicoidais anfipáticos parecem requerer que duas características sejam eficazes: carga líquida positiva, que os atrai para a superfície microbiana aniónica; e capacidade de assumir uma estrutura anfipática, o que favorece a inserção nas membranas microbianas. Pequenas concentrações inibiram a formação de biofilme de *Streptococcus mutans*. A microscopia confocal de varredura a laser mostrou que o GH12 reduziu efetivamente a biomassa do biofilme de *S. mutans* no 1º dia. Ensaios de citotoxicidade indicaram que o GH12 apresentou pouco efeito tóxico na viabilidade de fibroblastos gengivais humanos (Y. Wang et al., 2017).

Em resumo, se os tratamentos com peptídeos antibacterianos forem associados a uma boa higiene bucal, educação do paciente e cuidados profissionais preventivos, eles possuem um enorme potencial à medida que novas abordagens melhoram o tratamento e a prevenção da cárie dentária (Pepperney & Chikindas, 2011).

II. 3.2 Periodontite

A periodontite é uma doença inflamatória infecciosa crônica que afeta o periodonto, destruindo gradualmente o osso alveolar de suporte dentário. O periodonto é uma estrutura de suporte que envolve e suporta os dentes, este é constituído por diferentes tecidos, incluindo a gengiva, o cemento, o ligamento periodontal e o osso de suporte alveolar (Di Benedetto, Gigante, Colucci, & Grano, 2013).

Patogénese

A periodontite é principalmente causada por bactérias gram-negativas, como a *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* entre outras (Tabela 6). Que conjuntamente com outras bactérias gram-positivas e gram-negativas, encontram-se presentes na placa bacteriana formando um biofilme que impede o sistema imune do hospedeiro e os agentes antibacterianos de atuar. Recentemente, a cárie dentária e a periodontite foram descritas como precursores implicados no desenvolvimento inúmeras doenças sistémicas, como a doença cardiovascular, endocardite e pneumonia (Komatsuzawa et al., 2007).

Tabela 6. Bactérias periodontopatogénicas. Adaptado de Komatsuzawa et al., 2007

Espécie	Gram	Morfologia	Anaeróbio	Ativida Cariogénica
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	negativa	bacilo	obrigatórios	-
<i>Prevotella intermedia</i>	negativa	bacilo	obrigatórios	-
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	negativa	bacilo	facultativo	-
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	negativa	bacilo	obrigatórios	-
<i>Tannerella forsythensis</i>	negativa	bacilo	obrigatórios	-
<i>Treponema denticola</i>	negativa	spirochaetes	obrigatórios	-
<i>Eikenella corrodens</i>	negativa	bacilo	obrigatórios	-

A doença periodontal é causada por bactérias e antigénios que estimulam uma reação inflamatória local e consequente ativação do sistema imune inato (Garlet et al., 2006). A resposta inata do hospedeiro é iniciada por recetores que são principalmente expressos em células do sistema imune inato, mas que também foram identificados em tecidos periodontais. Assim que estes recetores reconhecem os agentes patogénicos,

ativam diferentes vias de imunidade inata, entre elas a produção de citocinas e quimiocinas que recrutam leucócitos não residentes para o espaço periodontal. Por sua vez, os leucócitos ativados, as células de imunidade adaptativa, secretam citocinas proinflamatórias e quimiocinas nos tecidos. Atualmente, aceita-se que a amplificação dessa resposta local inicial do hospedeiro (com duração de aproximadamente 21 dias) resulte na propagação da inflamação e leve à destruição dos tecidos periodontais moles e mineralizados (Figura 7) (Cochran, 2008; Di Benedetto et al., 2013).

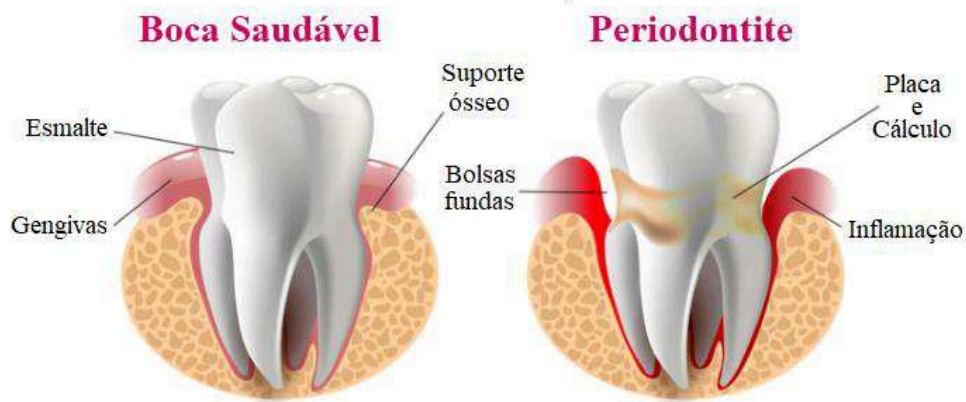


Figura 7. Ilustração da periodontite. Retirado de Centro Médico Dentário e Estético Integrado, 2017

Tratamento atual

O tratamento convencional para periodontite consiste na remoção mecânica dos agentes bacterianos, reduzindo assim o foco infeccioso e levando à resolução da inflamação e controlo da doença periodontal. No entanto, o tratamento padrão pode não ser uma terapia suficiente ou definitiva que resulte em melhorias clínicas, exigindo uma abordagem biológica mais sofisticada. A modulação da resposta do hospedeiro é considerada uma nova terapia promissora e consiste em modular os mecanismos de defesa do hospedeiro em resposta à inflamação. Por exemplo, a dioxíciclina inibe as metaloproteinases da matriz derivadas do hospedeiro, responsáveis pela degradação dos tecidos moles e mineralizados, resultando, assim, na redução da progressão da periodontite (Payne & Golub, 2011). No entanto, várias vias de sinalização estão envolvidas na destruição do tecido periodontal e, portanto, para alcançar resultados a

longo prazo, como a prevenção da perda dentária, pode ser necessário bloquear inúmeras vias. Por outro lado, a modulação imunológica do hospedeiro farmacologicamente pode resultar em efeitos adversos, exigindo, portanto, uma monitorização cuidadosa desta abordagem (Di Benedetto et al., 2013; Güncü, Yilmaz, Könönen, & Gürsoy, 2015).

No geral, os médicos dentistas procuram uma ferramenta de diagnóstico, de preferência não invasiva, para determinar o estado atual da doença periodontal, monitorizar a resposta da terapia aplicada, e medir o grau de suscetibilidade à progressão da doença. As ferramentas de diagnóstico convencionais como a profundidade de sondagem, o sangramento à sondagem, e o nível de inserção clínico são inadequados para identificação de pacientes em risco de progressão da doença periodontal. A saliva tem uma grande importância na manutenção da saúde oral, e nas duas últimas décadas, tem sido potencialmente associada à deteção de doenças sistémicas e orais, como cáries, periodontite, cancro oral e da mama, bem como hepatite (Güncü et al., 2015).

Utilização de péptidos antimicrobianos na periodontite

Biomarcadores específicos foram identificados a partir da saliva, refletindo as três características principais dos processos patogénicos na doença periodontal, ou seja, inflamação induzida por infeção, degradação de colagénio e renovação óssea. As enzimas, proteínas e outros mediadores inflamatórios, derivados dos hospedeiros e bacterianos, são promissores como biomarcadores salivares para o diagnóstico da doença periodontal (W.V. et al., 2009). Nos tecidos periodontais infetados, numerosas citocinas são secretadas como parte da resposta inata pelas células residentes (células epiteliais, fibroblastos) e neutrófilos. Há fortes evidências que sugerem que a IL-1b salivar é um biomarcador relevante de periodontite, enquanto nenhuma associação significativa foi encontrada entre os níveis salivares de TNF- α ou IL-6 e a presença de periodontite (Güncü et al., 2015; Taylor, 2014). As metaloproteases derivadas de hospedeiros são consideradas iniciadoras da degradação da matriz extracelular associada à periodontite. Especialmente a MMP-8, uma colagenase neutrofílica, tem o potencial de ser usada como um biomarcador de destruição periodontal. Em vários estudos, foi demonstrado que a atividade da MMP-8 é elevada na saliva de pacientes com periodontite em comparação com seus controlos periodontalmente saudáveis (Güncü et al., 2015).

Existem disparidades substanciais na expressão de pequenos AMP catiónicos, incluindo LL-37 e defensinas, em tecidos periodontais e na saliva, podendo estar ligadas

à patogénese da doença periodontal, bem como a de outras doenças inflamatórias e infecciosas orais. Portanto, a associação entre a expressão alterada de AMPs e alguns tipos de periodontite deve ser mais detalhadamente explorada. Talvez alguns peptídeos possam ser desenvolvidos como biomarcadores para o diagnóstico e / ou prognóstico de doenças orais no futuro (Mishra, Apeksha, Koppolu, & Lingam, 2015).

A literatura atual sugere que os peptídeos antimicrobianos possam ter possíveis interligações mecanicistas entre as doenças periodontais como subtexto para um meio dos seus fatores de risco. No entanto, tais evidências são muito limitadas e mais estudos *in vivo* e *in vitro* são necessários para esclarecer a natureza de tais relações. Em particular, considerando a relação bidirecional das doenças periodontais com as doenças imunes e metabólicas, uma maior compreensão das AMPs como mediadores compartilhados é essencial para desvendar o seu valor como candidatos terapêuticos ou biomarcadores (S. Li et al., 2018). No geral, as evidências apresentam limitações, o que requer mais estudos sobre AMPs, doenças periodontais e fatores de risco comuns. Recomenda-se a realização de estudos longitudinais clínicos para validar os resultados disponíveis (S. Li et al., 2018).

Por exemplo o AMP Nal-P-113 mostrou poder ser aplicado de forma efetiva na prática clínica como agente biológico, tendo melhorado o estado clínico periodontal ao inibir o crescimento de patógenos periodontais e ao controlar a formação de biofilmes dentários. Desta forma foi sugerida a sua utilização como meio auxiliar para prevenir ou curar a periodontite futuramente (H. Wang et al., 2018).

II. 3.3 Endodontia

Patogénese

As lesões cariosas são a causa mais comuns de infecções pulpares, e a progressão dessa doença é impulsionada por fatores como a virulência e proliferação de microrganismos (Zero, Zandona, Vail, & Spolnik, 2011). A polpa dentária é um tecido imunocompetente que, em muitos casos, pode restabelecer um status saudável quando o patógeno é removido (Lima et al., 2015). A inflamação pulpar começa antes do contato direto entre agentes patogénicos e o tecido pulpar, em que as células pulpares inflamatórias reagem ao estágio inicial da cárie, iniciando uma inflamação crónica na área subodontoblástica. As células mononucleares representam a primeira linha celular de defesa pulpar (Zero et al., 2011). Desta forma, a progressão da lesão cariada leva ao aumento do número de células inflamatórias, e os neutrófilos surgem neste ambiente infeccioso. Durante a resposta inflamatória / imune da polpa, as paredes dentinárias mineralizadas e inextensíveis impedem o desenvolvimento de edema, o que compromete a circulação sanguínea e isola a polpa necrótica das respostas de defesa do corpo, permitindo que a infeção gradualmente se perpetue até atingir a polpa inteira. Após a necrose pulpar, a infeção evolui para a região periapical. Este processo pode desencadear uma reação inflamatória inespecífica seguida de uma resposta imune específica, bem como destruição óssea na região periapical (Lima et al., 2015).

A seleção de microrganismos na polpa necrótica ao longo do tempo envolve condições de baixo potencial de redução de oxigénio, redução do consumo de oxigénio e disponibilidade de nutrientes, aumentando a degradação celular e também a presença de subprodutos bacterianos (José F. Siqueira, 2002). Os microrganismos que se adaptam a estas condições podem colonizar o canal radicular durante ou após a terapia endodôntica e causar dor persistente, prejudicando a sensibilidade aos antibióticos, inibindo a quimiotaxia dos fagócitos neutrofílicos e mononucleares. Estes patogenos também podem produzir enzimas (hialuronidase, collagenase, condroitinase, fosfatase ácida) e endotoxinas relacionadas com danos teciduais diretos e indiretos. Além disso, o perfil de infeção do canal radicular tende a ser anaeróbico e é precedido por infeções aeróbicas ou pelo suprimento sanguíneo comprometido (Lima et al., 2015; José F. Siqueira, 2002).

Vários microrganismos presentes em canais radiculares infetados são capazes de sobreviver a longos períodos de oxigénio e nutrientes escassos. Além disso, resistem às mudanças ambientais e atingem números suficientemente elevados para causar a

perpetuação da infecção e a lesão periapical, ao superar as defesas do hospedeiro. As evidências indicam que a falha do tratamento endodôntico pode ser motivada pela presença / persistência destes agentes patogénicos, uma vez que são resistentes a procedimentos de desinfecção na porção apical. Amostras de pacientes submetidos a retratamento endodôntico revelaram a prevalência de *Enterococcus faecalis*, *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Propionibacterium propionicum*, *Filifactor alocis*, *Dialister pneumosintes* (Lima et al., 2015). *Candida albicans*, *E. faecalis*, *Propionibacterium acnes*, *P. propionicum*, *Actinomyces naeslundii*, *Actinomyces odontolyticus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Anaerococcus prevotii*, *Eggerthella lenta*, *Gemella morbillorum*, *Parvimonas micra*, *P. alactolyticus*, *Streptococcus anginosus* e *Streptococcusmitis* (J. F. Siqueira & Rôçac, 2009).

Aquando da migração dos microrganismos para o tecido periapical, estes são circundados por tecido inflamatório, neutrófilos polimorfonucleares ou por epitélio, representando uma resposta imunoinflamatória contra a evolução da infecção. O exsudato inflamatório apresenta grande número de células imunocompetentes (macrófagos, linfócitos CD4 +, CD8 + e CD30 +; células *natural killers* (NK); mastócitos; e eosinófilos), envolvidos na resposta imune inata. Desta forma, as células são capazes de fagocitar microrganismos e células mortas (Teixeira-Salum et al., 2010).

A manutenção da resposta imunitária adaptativa na área periapical culmina com os eventos osteoimunológicos que levam à reabsorção óssea peri radicular (Teixeira-Salum et al., 2010). A reabsorção óssea compreende osteoclastogénese e atividade osteoclástica (Lima et al., 2015). As evidências sugerem que citocinas produzidas por células imunocompetentes em lesões periapicais podem ativar ou inibir a função dos osteoclastos, afetando a destruição óssea periapical (Teixeira-Salum et al., 2010). Neste processo, as citocinas, como fator de necrose tumoral, produzidas pelos linfócitos T *helper* tipo 1 (Th1), ativam o processo de reabsorção óssea, enquanto citocinas como IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13, produzidas pelos linfócitos T *helper* tipo 2 (Th2) inibem este processo (Lima et al., 2015; Teixeira-Salum et al., 2010). O envolvimento de algumas destas citocinas está relacionado com o processo inflamatório das lesões periapicais, como por exemplo, o aumento de IL-10 é consistente com uma diminuição na resposta pró-inflamatória e pode exercer um efeito supressor sobre as lesões periapicais (Lima et al., 2015).

A taxa de sucesso do tratamento endodôntico em dentes com lesão inflamatória é à volta de 95%. No entanto, esse número pode ser reduzido para aproximadamente 85%

em casos de polpa necrótica com periodontite apical. Existem duas opções possíveis para a correção das falhas da terapia endodôntica: retratamento ou cirurgia endodôntica. O retratamento endodôntico pode ter uma taxa de sucesso de 70%. A cirurgia endodôntica é o procedimento com maior grau de invasão e sua taxa de sucesso é de aproximadamente 90%. Entretanto, esse sucesso também depende da qualidade da obturação e restauração, relacionada à ausência de microinfiltração coronariana (Lima et al., 2015).

Tratamento atual

O tratamento endodôntico e o retratamento pretendem alcançar a cicatrização completa e a regeneração dos tecidos periapicais. Este inclui instrumentação mecânica, irrigação/aspiração e exposição à medicação intra-canal com posterior preenchimento do canal radicular, com o objectivo de eliminar microrganismos residentes em ramificações do canal principal e dos túbulos dentinários. Desta forma, a medicação intra-canal e os irrigantes completam a ação antimicrobiana da terapia endodôntica (Lima et al., 2015).

No entanto, a medicação intra-canal disponível não possui todas as propriedades desejáveis no contexto da infecção endodôntica e periodontite apical. Idealmente, devem apresentar não apenas um alto desempenho antimicrobiano, mas também uma atividade imunomoduladora e reparadora, sem danos para o hospedeiro. Além disso, existem vários níveis de resistência aos medicamentos do canal radicular. Assim, os agentes tradicionalmente utilizados para esse fim apresentam uma atividade limitada, suportando a necessidade de novas abordagens. Por exemplo, a medicação permanece dentro do canal radicular por um determinado período de tempo durante a terapia endodôntica pelo que deve além das propriedades antimicrobianas, ser capaz de neutralizar produtos tóxicos, controlar a exsudação persistente e diminuir a inflamação perirradicular e a dor, além de estimular o reparo do tecido mineralizado e prevenir a reinfeção. Agentes intra-canais típicos incluem hidróxido de cálcio, antibióticos, biocidas, compostos fenólicos e não fenólicos e iodo (Athanasiadis, Abbott, & Walsh, 2007).

O hidróxido de cálcio é o medicamento intra-canal mais utilizado e efetivo. As suas propriedades incluem biocompatibilidade, baixa difusão, baixa solubilidade, efeito antimicrobiano e mineralização por um mecanismo baseado na dissociação em iões (grupos cálcio e hidroxila) em meio aquoso. O hidróxido de cálcio atua como uma barreira física, ocupando os espaços no canal radicular, evitando assim a entrada, manutenção e crescimento de bactérias. Além disso, o pH elevado do hidróxido de cálcio pode interferir

na permeabilidade da membrana citoplasmática das bactérias, interferindo assim na atividade da enzima de controlo, que possui funções essenciais para as bactérias (metabolismo, crescimento e divisão). Esse efeito alcalinizante induz a quebra das ligações iónicas das estruturas terciárias das proteínas, inibindo a atividade biológica das enzimas por interferir na sua conformação estrutural. A eficácia hidróxido de cálcio depende da difusão dos iões hidroxilo nos túbulos dentinários, excedendo a capacidade de tamponamento da dentina em níveis favoráveis à destruição bacteriana. Isto indica-nos o seu uso por longos períodos para permitir a acessibilidade a canais de difusão lateral (Lima et al., 2015). Além disso, a combinação de medicações intra-canais pode gerar efeitos aditivos ou sinérgicos. Dadas estas exigências, as desvantagens deste agente são, a inibição do efeito antimicrobiano pela dentina, baixa solubilidade e difusão que requerem tempo, variação no potencial alcalino de diferentes formulações e promoção da adesão de bactérias ao colágeno (Athanasiadis et al., 2007). Outra grande desvantagem é que muitas espécies de micróbios prevalentes em lesões refratárias mantêm viabilidade em torno de pH 9, como *E. faecalis*, *C. albicans* e *Actinomyces radicidentis*, sendo resistentes à medicação intra-canal (Lima et al., 2015; J. F. Siqueira & Rôças, 2009).

Como a microbiologia endodôntica apresenta muitos microrganismos encontrados na doença cárie e periodontal, é plausível que os péptidos ativos para essas doenças possam afetar a microbiota endodôntica (Lima et al., 2015). Os agentes antimicrobianos que efetivamente eliminam espécies resistentes em canais radiculares têm o potencial de melhorar o tratamento endodôntico (Turner, Love, & Lyons, 2004). A vasta microbiota endodôntica é extremamente rica em diferentes tipos e espécies de microrganismos (Tabela 7). Portanto, a procura por agentes antimicrobianos para terapia endodôntica está em andamento, e existem alguns péptidos antimicrobianos ativos contra uma microbiota endodôntica (Tabela 8) (Lima et al., 2015).

Tabela 7. Micro-organismos isolados de canais radiculares com lesões apicais. Adaptado de Lima et al., 2015

Bactérias Gram-positivas	<i>Actinomyces israeli</i> , <i>Actinomyces naeslundii</i> , <i>Actinomyces odontolyticus</i> , <i>Actinomyces viscosus</i> , <i>Atopobium rimae</i> , <i>Corynebacterium matruchotii</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Eubacterium aerofaciens</i> , <i>Eubacterium alactolyticum</i> , <i>Eubacterium lentum</i> , <i>Eubacterium saburreum</i> , <i>Filifactor alocis</i> , <i>Olsenella uli</i> , <i>Parvimonas micra</i> , <i>Peptostreptococcus anaerobius</i> , <i>Peptostreptococcus magnus</i> , <i>Peptostreptococcus micros</i> , <i>Propionibacterium acnes</i> , <i>Propionibacterium propionicum</i> , <i>Pseudoramibacter alactolyticus</i> , <i>Streptococcus anginosus</i> , <i>Streptococcus constellatus</i> , <i>Streptococcus gordonii</i> , <i>Streptococcus intermedius</i> , <i>Streptococcus milleri</i> , <i>Streptococcus mitis</i> .
Bactérias Gram-negativas	<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> , <i>Bacteroides forsythus</i> , <i>Bacteroides melaninogenicu</i> , <i>Burkholderia cepacia</i> , <i>Campylobacter gracilis</i> , <i>Capnocytophaga gingivalis</i> , <i>Dialister invisus</i> , <i>Dialister pneumosintes</i> , <i>Eikenella corrodens</i> , <i>Fusobacterium necrophorum</i> , <i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>Fusobacterium periodonticum</i> , <i>Haemophilus aphrophilus</i> , <i>Leptotrichia buccalis</i> , <i>Neisseria mucosa</i> , <i>Porphyromonas endodontalis</i> , <i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Prevotella baroniae</i> , <i>Prevotella buccae</i> , <i>Prevotella intermedia</i> , <i>Prevotella melaninogenica</i> , <i>Prevotella nigrescens</i> , <i>Prevotella oralis</i> , <i>Prevotella tanneriae</i> , <i>Selenomonas sputigena</i> , <i>Tannerella forsythia</i> , <i>Treponema denticola</i> , <i>Treponema maltophilum</i> , <i>Treponema socranskii</i> , <i>Veillonella parvula</i> , <i>Wolinella recta</i> .
Fungos	<i>Candida albicans</i> .

Utilização de péptidos antimicrobianos no tratamento endodôntico

O AMP nisina, demonstrou um forte potencial na terapia endodôntica (Turner et al., 2004). É um AMP derivado de *Lactococcus lactis*, com atividade contra muitas bactérias Gram-positivas. A nisina interage com a membrana fosfolipídica e induz o extravasamento celular. Como medicação intra-canal, é capaz de reduzir o crescimento de *Streptococcus gordonii* e *E. faecalis* em aproximadamente metade, de forma semelhante ao hidróxido de cálcio (Lima et al., 2015; Turner et al., 2004).

A β -defensina 3 humana também foi estudada com aplicação em terapia endodôntica, e demonstrou melhor desempenho antimicrobiano comparado ao hidróxido de cálcio e clorexidina. Este péptido possui propriedades antibacterianas, antiendotoxinas e imunomoduladoras, além de baixa citotoxicidade para as células hospedeiras (Klüver et al., 2005). A β -defensinas 3 humana também foi capaz de inibir a produção de TNF- α e IL-8 na presença de *E. faecalis* mas apesar de resultados preliminares promissores, o comportamento dessas biomoléculas em infecções mistas ainda deve ser avaliado (Lima et al., 2015).

A actividade de 10 AMP sintéticos foram testadas contra estirpes do grupo *Streptococcus milleri* para fins endodônticos. Estes incluíam os péptidos dos neutrófilos humanos 1 e 2, histatinas 5 e 8 (da saliva humana), indolicidina (de granulócitos bovinos), cecropinas B e P1 (da traça hemolinfa), magainina II (do intestino e pele dos anfíbios) e mastoparan. (do veneno da vespa). Verificou-se que embora os péptidos dos neutrófilos humanos, histamina 8, cecropina P1 e magainina não inibiram nenhuma das estirpes testadas. Outros péptidos inibiram 10% (histamina 5), 30% (cecropina B), 91% (indolicidina), 95% (magnemina amida) e 90% (mastoparano) de estirpes de *S. milleri* (Bartie, Devine, Wilson, & Lewis, 2008).

Alguns microrganismos endodônticos são capazes de produzir péptidos, como *pseudomonas spp.*, que produzem o péptido PsVP-10. Este péptido é capaz de inibir o crescimento de muitas bactérias Gram-positivas e negativas e é resistente ao calor, a alterações de pH e enzimas proteolíticas. Todas as estirpes de *E. faecalis*, de isolados clínicos (infecção do trato urinário, tecidos moles e corrente sanguínea) eram suscetíveis ao péptido PsVP-10 (Padilla, Lobos, Brevis, Abaca, & Hubert, 2004).

Uma evolução considerável pode ser observada na área endodôntica em relação à instrumentação e mecânica do processo de tratamento. No entanto, as taxas de tratamento endodôntico sem sucesso continuam altas. Apesar dos avanços obtidos no entendimento dos mecanismos de ação das soluções irrigantes e do canal radicular utilizados durante o tratamento endodôntico, pouco se tem observado no desenho de novos medicamentos para esse fim. Neste contexto, é necessária a busca de novas abordagens para a limpeza química endodôntica. Existem muitos AMPs que apresentam excelente atividade antimicrobiana contra a microbiota endodôntica em concentrações inibitórias relativamente baixas (Tabela 8) e que podem modular uma resposta imune exacerbada. Entretanto, apesar destes indicadores, há um desequilíbrio entre o número de estudos e o número de patentes relacionadas à endodontia e aos péptidos antimicrobianos.

Tabela 8. Lista de AMPs ativos contra micro-organismos presentes na microbiota endodôntica e a respetiva concentração mínima inibitória. Adaptado de Lima et al., 2015

Péptido	Microrganismo	Concentração mínima inibitória (μ M)
Beta-defensina humana (HBD) 3	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	5
HBD3	<i>Enterococcus faecalis</i>	10
HBD3	<i>Tannerella forsythia</i>	>25
HBD3	<i>Eikenella corrodens</i>	2
HBD3	<i>Candida albicans</i>	10
SMPAP29	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	1
Defensina de neutrófilos humanos 1	<i>Prevotella intermedia</i>	2
SMAP14A	<i>Peptostreptococcus micros</i>	2
LL-37	<i>Treponema denticola</i>	19
LL-37	<i>Enterococcus faecalis</i>	5
LL-37	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	5
LL-37	<i>Tannerella forsythia</i>	>47
LL-37	<i>Eikenella corrodens</i>	2
HBD1	<i>Enterococcus faecalis</i>	10
HBD2	<i>Enterococcus faecalis</i>	5
HBD3	<i>Enterococcus faecalis</i>	1
HBD4	<i>Enterococcus faecalis</i>	3
Clavanina A	<i>Enterococcus faecalis</i>	1
Cecropina B	<i>Prevotella nigrescens</i>	25
AR23	<i>Prevotella melaninogenica</i>	3
Melitina	<i>Candida albicans</i>	6
SMAP28	<i>Actinomyces naeslundii</i>	1
SMAP28	<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	1
SMAP28	<i>Actinomyces israelii</i>	1
Meta-felineno etilileno (mPE)	<i>Actinomyces viscosus</i>	2
mPE	<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	1
mPE	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	4
Crisofisina 1	<i>Enterococcus faecalis</i>	3
Crisofisina 1	<i>Actinomyces naeslundii</i>	3
Crisofisina 1	<i>Streptococcus gordonii</i>	3
Nisina	<i>Streptococcus gordonii</i>	150
Nisina	<i>Enterococcus faecalis</i>	150

As atividades combinadas destas biomoléculas podem permitir que microrganismos sejam eliminados e uma resposta imune exacerbada seja modulada, regulando negativamente a reabsorção óssea. Alguns AMPs também são biocompatíveis

e podem apresentar efeitos supressores osteoclastogénicos e efeitos regenerativos a nível tecidular. Todas estas razões indicam que o tratamento endodôntico baseado em péptidos antimicrobianos é uma opção emergente e promissora. No entanto, a eficácia e especificidade da atividade peptídica antimicrobiana deve ser avaliada sob diferentes parâmetros, tais como condições fisiológicas *in vivo*, concentração de péptidos, ações sinérgicas e antagonistas e características de replicação bacteriana. Estes parâmetros devem conduzir estudos adicionais para verificar o potencial da biotecnologia de usar AMPs na terapia endodôntica, juntamente com as maneiras de produzir esses péptidos a um custo baixo e em larga escala. A eliminação de microrganismos endodônticos do sistema de canais radiculares e também a modulação da resposta inflamatória-imune periapical permitem a aposição óssea, trazendo maiores níveis de sucesso na terapia endodôntica, levando a uma maior expectativa de vida dos dentes (Lima et al., 2015).

II. 3.4 Implantologia

Os implantes dentários são considerados uma das inovações mais importantes na medicina dentária contemporânea. Desde a introdução dos implantes de titânio para uso intraoral no final da década de 1950, que a implantologia se tonou das áreas mais ativas e promissoras da medicina dentária e é uma opção popular para a reabilitação oral de pacientes desdentados parciais e totais (John, Chen, & Parashos, 2007).

Os implantes dentários osseointegráveis são frequentemente preferíveis às próteses convencionais por várias razões, como a preservação da estrutura dos dentes adjacentes e melhor conforto, resultado estético, funções e estabilidade. Em particular, para pacientes que não são capazes de se adaptar a dentaduras convencionais ou que comprometeram o osso local, o tratamento com implantes dentários oferece uma solução que pode gerar resultados mais satisfatórios (G. Wang, Gao, & Lo, 2015). A taxa de sobrevida de 10 anos relatada é de aproximadamente 90%, tornando-a uma modalidade de tratamento razoavelmente previsível (Mattheos et al., 2009).

Apesar das vantagens, os implantes dentários não são a solução para todos os casos de falta de dentes, e o sucesso clínico só é possível quando o plano de tratamento é baseado numa avaliação completa da condição do paciente e consideração cuidadosa das indicações e contraindicações. Alguns riscos estão envolvidos e possíveis complicações podem ocorrer durante as fases cirúrgica, pós-cirúrgica e a longo prazo. Além disso, os hábitos diários de autocuidado do paciente, como manutenção da boa higiene bucal e

abstinência do tabagismo, são essenciais para a longevidade dos implantes (Paquette, Brodala, & Williams, 2006; G. Wang et al., 2015).

Patogénese

Embora a taxa de sucesso do implante seja alta, ocorrem falhas devido a infecções associadas ao implante, o que resulta em perda óssea ao redor do implante e subsequente perda da osseointegração. Dependendo das características e localização, esta doença ocorre em duas formas comuns; peri-implantite e mucosite peri-implantar (Shi et al., 2015). A peri-implantite foi descrita pela primeira vez, por Mombelli, como uma doença infecciosa semelhante à periodontite como pode ser visto na Figura 8.

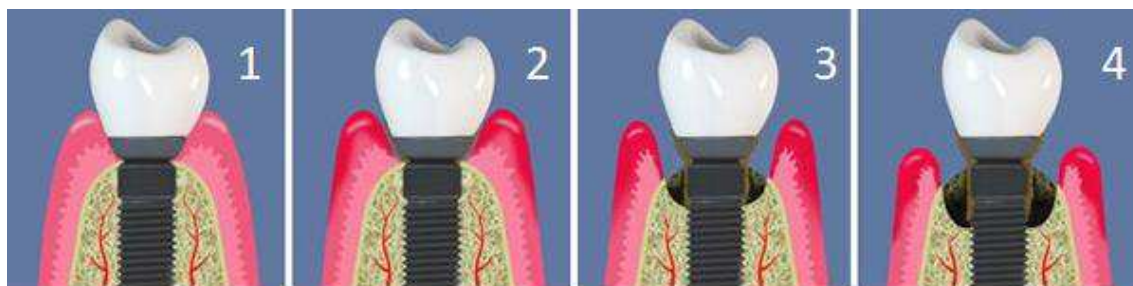


Figura 8. Desenvolvimento da peri-implantite. Adaptado de Cabinet Dentaire du doctaire Goes P., 2016

A peri-implantite ocorre em 28% a 56% dos pacientes afetados e em 12% a 43% dos implantes individuais. A evolução de revisões sistemáticas e meta-análises permitiram medições precisas das frequências de peri-implantite para diferentes próteses. A peri-implantite ocorreu em 18,8% dos pacientes e em 9,6% dos implantes em pacientes normais e de alto risco acompanhados em cinco anos (Atieh, Alsabeeha, Faggion, & Duncan, 2012). Estudos de acompanhamento de médio e longo prazo mostraram que a peri-implantite ocorreu em 10,4% dos pacientes que necessitaram de restaurações de arcada completa. Além disso, em 9,1% dos pacientes que necessitaram de próteses sobre implantes, 8% dos implantes desenvolveram peri-implantite. No geral, 5,4% dos implantes e 9,4% das próteses desenvolveram peri-implantite em pacientes que necessitavam de próteses dentárias fixas implanto-suportadas (Atieh et al., 2012; Shi et al., 2015).

Tratamento atual

Existem poucos tratamentos para peri-implantite. A terapia para peri-implantite inclui fases não cirúrgicas e cirúrgicas. Desbridamento mecânico, ultra-sônico ou mediado por laser, isoladamente ou em combinação com agentes antissépticos e / ou antibióticos, ocorre na fase não cirúrgica, enquanto a fase cirúrgica inclui técnicas ressetivas ou regenerativas. Stress mecânico excessivo, um desenho de implante pobre, corrosão e algumas doenças sistêmicas, incluindo diabetes *mellitus*, osteoporose e tratamento a longo prazo com corticóides, radiação ou quimioterapia são importantes fatores de risco associados ao surgimento e desenvolvimento de peri-implantite. Além disso, as infecções bacterianas desempenham um papel importante no insucesso dos implantes dentários e no desenvolvimento de peri-implantite. A microbiota presente em pacientes com peri-implantite é semelhante aos pacientes afetados por periodontite avançada. Altos níveis de bactérias Gram-negativas anaeróbicas não móveis, como *Porphyromonas gingivalis* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, estão presentes em ambos os estados patológicos. No entanto, a microflora perimplantar difere das espécies encontradas na superfície dos dentes. Por exemplo, *Staphylococcus aureus* tem sido associado a sangramento à sondagem e supuração, provavelmente devido ao seu nível relativamente alto de adesividade às superfícies de titânio (Mombelli et al., 1987; Renvert, Lindahl, Renvert, & Persson, 2008; Shi et al., 2015).

Com uma prevalência crescente e terapias disponíveis limitadas, a peri-implantite tornou-se um dos tópicos de maior pesquisa. A peri-implantite começa no tecido mole no pescoço do implante, que é o limite entre o tecido duro e o mole. Uma estratégia para prevenir a peri-implantite é estabelecer um revestimento antimicrobiano no pescoço do implante. O revestimento ideal deve ter três propriedades essenciais: (1) inibir todos os patógenos da peri-implantite, (2) ter poucos efeitos citotóxicos e (3) manter a liberação do medicamento durante o período de cicatrização após a colocação do implante. Implantes com esses revestimentos em seus pescoços podem limitar o crescimento de bactérias após a colocação (Shi et al., 2015).

Os biomateriais para potenciais aplicações devem estar em contato com o sangue, não devem causar a destruição dos eritrócitos. A hemólise é utilizada como ensaio de toxicidade aguda para avaliar a compatibilidade de materiais com eritrócitos (Fischer, Li, Ahlemeyer, Krieglstein, & Kissel, 2003). O péptido Tet213, foi ligado ao colagénio IV, chamando-se assim AMPCol, e ao revestir uma superfície de titânio limitou a formação inicial de um biofilme inicial. Os resultados mostram que o revestimento do péptido

AMPCol não produziu hemólise. Os resultados de 3 horas e 24 horas mostram que os revestimentos estavam estáveis no sangue. A molhabilidade da superfície é geralmente aceita como um dos principais parâmetros que afetam a compatibilidade eritrocitária de um revestimento. A viabilidade celular melhorada também pode ser atribuída a um aumento na molhabilidade e à presença de colágeno IV, que está presente nas membranas basais dos tecidos humanos na lâmina basal interna do epitélio peri-implantar. O colágeno IV também é um componente importante na interação de células com a membrana basal subjacente, e essa interação é fundamental para vários processos biológicos, como adesão celular, migração, proliferação e diferenciação. Juntando o fato do colágeno IV ser o substrato de ligação para os queratinócitos, a presença de colágeno IV torna o revestimento de AMPCol biocompatível para células epiteliais, demonstrando excelente atividade antimicrobiana a longo prazo (Khoshnoodi, Pedchenko, & Hudson, 2008; Shi et al., 2015).

Utilização de péptidos antimicrobianos na área da implantologia

Péptidos antimicrobianos catiónicos e derivados de histamina adsorvidos em Titânio mostraram prevenir a formação de biofilme (Kazemzadeh-Narbat et al., 2010). Em particular o revestimento com o péptido antimicrobiano, GL13K, derivado da proteína secretora da parótida, e previamente demonstrado bactericida e bacteriostática em solução, mostrou ser resistente à degradação, ativo contra *Porphyromonas gingivalis*, e citocompatível *in vitro*. A *Porphyromonas gingivalis* é um patógeno associado à peri-implantite dentária, uma resposta inflamatória à bactéria que resulta em perda óssea e falha do implante. As modificações superficiais obtiveram um revestimento GL13K homogêneo, altamente hidrofóbico e fortemente ancorado, resistente à degradação mecânica, termoquímica e enzimática. Os revestimentos GL13K tiveram um efeito bactericida e, assim, reduziram significativamente o número de bactérias viáveis em comparação com as superfícies de controle. Finalmente, a proliferação adequada de osteoblastos e fibroblastos gengivais humanos demonstrou a citocompatibilidade do revestimento GL13K. A robustez, a atividade antimicrobiana e a citocompatibilidade do titânio GL13K-biofuncionalizado tornam-no num candidato promissor para a inibição sustentada do crescimento do biofilme bacteriano. Esta química superficial fornece uma base para o desenvolvimento de superfícies bioativas multifuncionais para reduzir as morbidades dos pacientes e melhorar a eficácia clínica a longo prazo dos implantes

dentários e ortopédicos metálicos (Holmberg et al., 2013). Adicionalmente implantes dentários de titânio com um revestimento antimicrobiano GL13K mostraram também permitir a osseointegração *in vivo* do implante, com taxas de crescimento ósseo semelhantes aos implantes dentários não revestidos, até 6 semanas de implantação em fêmures de coelho (X. Chen et al., 2017).

O revestimento com β -defensinas humana HBD-2 mostrou também ser biocompatível, tendo-se verificado um aumento na proliferação celular. No entanto são recomendados ensaios *in vivo* de implantes recobertos com HBD-2 de forma a avaliar as suas propriedades antimicrobianas clínicas e a segurança e eficácia da regeneração tecidual peri-implantar na sua presença (Warnke et al., 2013).

III. CONCLUSÃO

A resistência antibiótica a agentes patogênicos humanos tem sido um importante impulsionador para a procura de novas alternativas. Em contraste à sua origem, apenas nas últimas décadas, o estudo de AMPs alcançou uma atenção crescente, pois pode ser uma opção terapêutica mais precoce no combate a microrganismos.

Os AMPs apresentam ser uma alternativa promissora às terapias padrão, com uma ampla gama de atividade e mecanismos de ação menos propensos à indução de resistência relativamente aos antibióticos convencionais. Contudo, a indução da resistência bacteriana não é impossível, havendo já descrições destes mesmos mecanismos.

O médico dentista procura não só os melhores tratamentos possíveis, como também novas maneiras de prevenir e diagnosticar patologias orais. Desta forma, os AMPs poderão ser uma ferramenta poderosa de auxílio. Com o conhecimento adquirido na realização desta dissertação, é possível especular aplicações em materiais num consultório dentário, como por exemplo vernizes, colutórios, e pastas dentífricas.

No geral, os AMPs demonstram resultados positivos contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas da cavidade oral, baixa toxicidade, um alto índice de seletividade, solubilidade, e são altamente metabolizáveis pelo organismo. Embora alguns destes resultados mostrem o grande potencial no tratamento de infeções orais e de alguns AMPs já estarem em desenvolvimento, tendo em vista o seu uso clínico, existem desafios consideráveis para a sua aplicação como a estabilidade peptídica, e a sua suscetibilidade à degradação proteolítica. Desta maneira, é importante analisar e investigar novas estratégias para aumentar ainda mais o seu potencial.

Ficam aqui expostas algumas potencialidades em patologias como a periodontite, processos cariogénicos, e peri-implantite, mas dado o potencial destes agentes, considero que as possibilidades de tratamento, prevenção e biomarcadores é ainda maior.

Em suma, é importante confirmar o benefício terapêutico *in vivo*, havendo a necessidade de futuros estudos para confirmar a total segurança e fiabilidade nestes agentes antimicrobianos.

IV. PERSPETIVAS FUTURAS

Futuros estudos devem ser conduzidos de forma a aumentar a compreensão do: papel desempenhado pelos péptidos antimicrobianos na resposta imune inata antibacteriana no contexto da cavidade oral e; os mecanismos moleculares subjacentes às atividades antimicrobianas. É crucial um avanço no desenvolvimento de abordagens terapêuticas utilizando esses péptidos antimicrobianos. Também será importante esclarecer melhor as suscetibilidades das bactérias orais, incluindo organismos comensais e patogénicos, aos péptidos antimicrobianos. O mecanismo de como as bactérias comensais na cavidade oral podem sobreviver na presença de péptidos antimicrobianos ainda não está claro. Para abordar esta questão, será necessário classificar um grande painel de isolados clínicos de estirpes bacterianas, com base na sua suscetibilidade a diferentes péptidos antimicrobianos. Isto permitirá identificar os genes e/ou moléculas que são comumente expressos por uma determinada classe bacteriana, tornando essa classe suscetível ou resistente a péptidos antimicrobianos distintos. Como consequência, os resultados destes estudos devem permitir aos investigadores obter informações sobre os mecanismos moleculares bacterianos pelos quais as bactérias se protegem contra o desafio antimicrobiano (Komatsuzawa et al., 2007).

Pode também haver potenciais aplicações dos péptidos antimicrobianos no diagnóstico de doenças orais; no entanto, ainda é necessário determinar a forma de como a concentração de péptidos antimicrobianos na saliva e/ou fluido gengival está associada a doenças orais. Estudos clínicos deverão envolver uma análise ligando a incidência de doenças orais para hospedar informações genéticas sobre péptidos antimicrobianos. Um desses esforços envolve o SNP (polimorfismo de nucleotídeo único), que está presente nos genes que codificam os péptidos antimicrobianos e parece estar associado à inflamação da mucosa oral associada às bactérias (Komatsuzawa et al., 2007).

Todos estes esforços, por sua vez, permitirão que os investigadores primeiro determinem e depois designem adequadamente os fatores de risco para infeção em indivíduos. Assim, não só ajudará a obter *insights* sobre as interações entre o sistema imune inato do hospedeiro e bactérias comensais e patogénicas, mas também resultará no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas e ferramentas de diagnóstico para complicações orais (Komatsuzawa et al., 2007).

V. BIBLIOGRAFIA

- Anaya-López, J. L., López-Meza, J. E., & Ochoa-Zarzosa, A. (2013). Bacterial resistance to cationic antimicrobial peptides. *Critical Reviews in Microbiology*, 39(2), 180–195. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2012.699025>
- Andersson, D. I., Hughes, D., & Kubicek-Sutherland, J. Z. (2016). Mechanisms and consequences of bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Drug Resistance Updates*, 26, 43–57. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2016.04.002>
- Athanassiadis, B., Abbott, P. V., & Walsh, L. J. (2007). The use of calcium hydroxide, antibiotics and biocides as antimicrobial medicaments in endodontics. *Australian Dental Journal*, 52(1 SUPPL.). <https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.2007.tb00527.x>
- Atieh, M. A., Alsabeeha, N. H. M., Faggion, C. M., & Duncan, W. J. (2012). The Frequency of Peri-Implant Diseases: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of Periodontology*, 1–15. <https://doi.org/10.1902/jop.2012.120592>
- Bahar, A. A., & Ren, D. (2013). Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals*, 6(12), 1543–1575. <https://doi.org/10.3390/ph6121543>
- Bartie, K. L., Devine, D. A., Wilson, M. J., & Lewis, M. A. O. (2008). In vitro susceptibility of the Streptococcus milleri group to antimicrobial peptides. *International Endodontic Journal*, 41(7), 586–592. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2008.01404.x>
- Bechinger, B., & Gorr, S. U. (2017). Antimicrobial Peptides: Mechanisms of Action and Resistance. *Journal of Dental Research*, 96(3), 254–260. <https://doi.org/10.1177/0022034516679973>
- Bernardino da Silva, L. (2017). Peptídeos Antimicrobianos.
- Cabinet Dentaire du docteur Goes P, 2016, Disponible em: https://dr-goes-philippe.chirurgiens-dentistes.fr/infos-patient/-Article-19557.aspx?fbclid=IwAR3oIBcT7QQDJX_35u-J9Uw3bweT9fP5QBz6EiOVX_8BYD-EUBDDtf-nsnI, Consultado a: 23/09/2018
- Centro Médico Dentário e Estético Integrado, 2017, Disponible em: <https://cemdei.com/noticias/2017/7/28/doencas-periodontais-diagnostico-e-tratamento>, Consultado a 23/09/2018
- Chen, L., Jia, L., Zhang, Q., Zhou, X., Liu, Z., Li, B., ... Luo, S. Z. (2017). A novel antimicrobial peptide against dental-carries-associated bacteria. *Anaerobe*, 47, 165–172. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2017.05.016>

- Chen, X., Zhou, X. C., Liu, S., Wu, R. F., Aparicio, C., & Wu, J. Y. (2017). In vivo osseointegration of dental implants with an antimicrobial peptide coating. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 28(5). <https://doi.org/10.1007/s10856-017-5885-8>
- Clinica Oral Concept 2016, consultado a 23/09/2018
Disponível em: <http://oralconcept.pt/dentisteria/>
Consultado em: 23/09/2018
- Cochran, D. L. (2008). Inflammation and Bone Loss in Periodontal Disease. *Journal of Periodontology*, 79(8s), 1569–1576. <https://doi.org/10.1902/jop.2008.080233>
- Colombo, N. H., Ribas, L. F. F., Pereira, J. A., Kreling, P. F., Kressirer, C. A., Tanner, A. C. R., & Duque, C. (2016). Antimicrobial peptides in saliva of children with severe early childhood caries. *Archives of Oral Biology*, 69, 40–46. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2016.05.009>
- Cruz, J., Ortiz, C., Guzmán, F., Fernández-Lafuente, R., & Torres, R. (2014). Antimicrobial Peptides: Promising Compounds Against Pathogenic Microorganisms. *Current Medicinal Chemistry*, 21(20), 2299–2321. <https://doi.org/10.2174/0929867321666140217110155>
- Cvitkovitch, D. G., Li, Y. H., & Ellen, R. P. (2003). Quorum sensing and biofilm formation in streptococcal infections. *Journal of Clinical Investigation*, 112(11), 1626–1632. <https://doi.org/10.1172/JCI200320430>. Streptococcal
- Dashper, S. G., Liu, S. W., & Reynolds, E. C. (2007). Antimicrobial peptides and their potential as oral therapeutic agents. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 13(4), 505–516. <https://doi.org/10.1007/s10989-007-9094-z>
- Di Benedetto, A., Gigante, I., Colucci, S., & Grano, M. (2013). Periodontal disease: Linking the primary inflammation to bone loss. *Clinical and Developmental Immunology*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/503754>
- Ding, Y., Wang, W., Fan, M., Tong, Z., Kuang, R., Jiang, W., & Ni, L. (2014). Antimicrobial and anti-biofilm effect of Bac8c on major bacteria associated with dental caries and Streptococcus mutans biofilms. *Peptides*, 52, 61–67. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2013.11.020>
- Fischer, D., Li, Y., Ahlemeyer, B., Kriegelstein, J., & Kissel, T. (2003). In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. *Biomaterials*, 24, 1121–1131. <https://doi.org/S0142961202004453> [pii]

- Galvão, M. (2013). Mecanismos de Resistência aos Antibióticos - Maria Galvão Baptista (20071294).
- Garima Kapoor, Saurabh Saigal, A. E. (2017). Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology*, 33(3), 300–305. <https://doi.org/10.4103/joacp.JOACP>
- Garlet, G. P., Cardoso, C. R., Silva, T. A., Ferreira, B. R., Ávila-Campos, M. J., Cunha, F. Q., & Silva, J. S. (2006). Cytokine pattern determines the progression of experimental periodontal disease induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* through the modulation of MMPs, RANKL, and their physiological inhibitors. *Oral Microbiology and Immunology*, 21(1), 12–20. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2005.00245.x>
- Gorr, S.U. (2009). Antimicrobial peptides of the oral cavity. *Periodontology 2000*, 51(1), 152–180. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2009.00310.x>
- Gorr, S. U., & Abdolhosseini, M. (2011). Antimicrobial peptides and periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology*, 38(SUPPL. 11), 126–141. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2010.01664.x>
- Guilhelmelli, F., Vilela, N., Albuquerque, P., Derengowski, L. da S., Silva-Pereira, I., & Kyaw, C. M. (2013). Antibiotic development challenges: The various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. *Frontiers in Microbiology*, 4(DEC), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00353>
- Güncü, G. N., Yilmaz, D., Könönen, E., & Gürsoy, U. K. (2015). Salivary Antimicrobial Peptides in Early Detection of Periodontitis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 5(December), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00099>
- Gupta, K., Kotian, A., Subramanian, H., Daniell, H., & Ali, H. (2015). Activation of human mast cells by retrocyclin and protegrin highlight their immunomodulatory and antimicrobial properties. *Oncotarget*, 6(30). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5611>
- Holmberg, K. V., Abdolhosseini, M., Li, Y., Chen, X., Gorr, S. U., & Aparicio, C. (2013). Bio-inspired stable antimicrobial peptide coatings for dental applications. *Acta Biomaterialia*, 9(9), 8224–8231. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.06.017>
- John, V., Chen, S., & Parashos, P. (2007). Implant or the natural tooth - A contemporary treatment planning dilemma? *Australian Dental Journal*, 52(1 SUPPL.). <https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.2007.tb00521.x>
- Kazemzadeh-Narbat, M., Kindrachuk, J., Duan, K., Jenssen, H., Hancock, R. E. W., &

- Wang, R. (2010). Antimicrobial peptides on calcium phosphate-coated titanium for the prevention of implant-associated infections. *Biomaterials*, 31(36), 9519–9526. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.08.035>
- Khoshnoodi, J., Pedchenko, V., & Hudson, B. G. (2008). Mammalian collagen IV. *Microscopy Research and Technique*, 71(5), 357–370. <https://doi.org/10.1002/jemt.20564>
- Klüver, E., Schulz-Maronde, S., Scheid, S., Meyer, B., Forssmann, W.-G., & Adermann, K. (2005). Structure-activity relation of human beta-defensin 3: influence of disulfide bonds and cysteine substitution on antimicrobial activity and cytotoxicity. *Biochemistry*, 44, 9804–9816. <https://doi.org/10.1021/bi050272k>
- Komatsuzawa, H., Ouhara, K., Kawai, T., Yamada, S., Fujiwara, T., Shiba, H., ... Sugai, M. (2007). Susceptibility of periodontopathogenic and cariogenic bacteria to defensins and potential therapeutic use of defensins in oral diseases. *Current Pharmaceutical Design*, 13(30), 3084–3095. <https://doi.org/10.2174/138161207782110426>
- Kumar, P., Kizhakkedathu, J. N., & Straus, S. K. (2018). Antimicrobial peptides: Diversity, mechanism of action and strategies to improve the activity and biocompatibility in vivo. *Biomolecules*, 8(1). <https://doi.org/10.3390/biom8010004>
- Lee, T.-H., N. Hall, K., & Aguilar, M.-I. (2015). Antimicrobial Peptide Structure and Mechanism of Action: A Focus on the Role of Membrane Structure. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 16(1), 25–39. <https://doi.org/10.2174/1568026615666150703121700>
- Leite, J. A. F. (2014). Antibioticoterapia em medicina dentaria, 170. Retrieved from [https://repositorio.ucp.pt/bitstream/10400.14/16279/1/Antibiotico Final 2.pdf](https://repositorio.ucp.pt/bitstream/10400.14/16279/1/Antibiotico%20Final%20.pdf)
- Li, S., Schmalz, G., Schmidt, J., Krause, F., Haak, R., & Ziebolz, D. (2018). Antimicrobial peptides as a possible interlink between periodontal diseases and its risk factors: A systematic review. *Journal of Periodontal Research*, 53(2), 145–155. <https://doi.org/10.1111/jre.12482>
- Li, X., Kolltveit, M., Tronstad, L., & Olsen, I. (2000). Systemic diseases caused by oral infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(4), 547–558. <https://doi.org/10.1128/CMR.13.4.547-558.2000>.Updated
- Lima, S. M. de F., de Pádua, G. M., Sousa, M. G. da C., Freire, M. de S., Franco, O. L., & Rezende, T. M. B. (2015). Antimicrobial peptide-based treatment for endodontic infections - Biotechnological innovation in endodontics. *Biotechnology Advances*,

- 33(1), 203–213. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.10.013>
- Liu, Y., Kamesh, A. C., Xiao, Y., Sun, V., Hayes, M., Daniell, H., & Koo, H. (2016). Topical delivery of low-cost protein drug candidates made in chloroplasts for biofilm disruption and uptake by oral epithelial cells. *Biomaterials*, 105, 156–166. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.07.042>
- Maisetta, G., Batoni, G., Esin, S., Luperini, F., Pardini, M., Bottai, D., ... Florio, W. (2003). Activity of Human β -Defensin 3 Alone or Combined with Other Antimicrobial Agents against Oral Bacteria Activity of Human α -Defensin 3 Alone or Combined with Other Antimicrobial Agents against Oral Bacteria, 47(10), 3–6. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.10.3349>
- Malanovic, N., & Lohner, K. (2016). *Antimicrobial peptides targeting Gram-positive bacteria*. *Pharmaceuticals* (Vol. 9). <https://doi.org/10.3390/ph9030059>
- Mattheos, N., Albrektsson, T., Buser, D., De Bruyn, H., Donos, N., Hjørting Hansen, E., ... Nattestad, A. (2009). Teaching and assessment of implant dentistry in undergraduate and postgraduate education: A European consensus. *European Journal of Dental Education*, 13(SUPPL1.), 10–17. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0579.2008.00556.x>
- Melo, M. N., Ferre, R., & Castanho, M. A. R. B. (2009). Antimicrobial peptides: Linking partition, activity and high membrane-bound concentrations. *Nature Reviews Microbiology*, 7(3), 245–250. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2095>
- Mishra, A., Apeksha, B., Koppolu, P., & Lingam, S. (2015). Role of antimicrobial peptides in periodontal innate defense mechanism. *Journal of Oral Research and Review*, 7(2), 74. <https://doi.org/10.4103/2249-4987.172500>
- Mombelli, A., Mac, V. O., Schiirch, E., & Np, L. (1987). The microbiota associated with successfuiorfaiing osseointegrated titanium impiants, 145–151.
- Moravej, H., Moravej, Z., Yazdanparast, M., Heiat, M., Mirhosseini, A., Moosazadeh Moghaddam, M., & Mirnejad, R. (2018). Antimicrobial Peptides: Features, Action, and Their Resistance Mechanisms in Bacteria. *Microbial Drug Resistance*, 00(00), mdr.2017.0392. <https://doi.org/10.1089/mdr.2017.0392>
- Ouhara, K., Komatsuzawa, H., & Yamada, S. (2005). Susceptibilities of periodontopathogenic and cariogenic bacteria to antibacterial peptides, b-defensins and LL37, produced by human epithelial cells. *Current Issues in Molecular Biology*, 7(2), 119–134. <https://doi.org/doi:10.1093/jac/dki103>
- Padilla, C., Lobos, O., Brevis, P., Abaca, P., & Hubert, E. (2004). In vitro antibacterial

- activity of the peptide PsVP-10 against antimicrobial-resistant *Enterococcus faecalis* isolated from clinical samples. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53(2), 390–392. <https://doi.org/10.1093/jac/dkh067>
- Palmer, R. J., Gordon, S. M., Cisar, J. O., & Kolenbrander, P. E. (2003). Coaggregation-mediated interactions of streptococci and actinomyces detected in initial human dental plaque. *Journal of Bacteriology*, 185(11), 3400–3409. <https://doi.org/10.1128/JB.185.11.3400-3409.2003>
- Paquette, D. W., Brodala, N., & Williams, R. C. (2006). Risk Factors for Endosseous Dental Implant Failure. *Dental Clinics of North America*, 50(3), 361–374. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2006.05.002>
- Payne, J. B., & Golub, L. M. (2011). Using tetracyclines to treat osteoporotic/osteopenic bone loss: From the basic science laboratory to the clinic. *Pharmacological Research*, 63(2), 121–129. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2010.10.006>
- Pepperney, A., & Chikindas, M. L. (2011). Antibacterial Peptides: Opportunities for the Prevention and Treatment of Dental Caries. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 3(2), 68–96. <https://doi.org/10.1007/s12602-011-9076-5>
- Phoenix, D. A., Dennison, S. R., & Harris, F. (2013). *Peptide and Protein Design for Biopharmaceutical Applications Peptide Drug Discovery and Development Peptides : Chemistry and Biology Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents Delivery Technologies for Biopharmaceuticals*. <https://doi.org/10.1002/9783527652853.ch1>
- Ramasamy A. (2014). A review of use of antibiotics in dentistry and recommendations for rational antibiotic usage by dentists *. *IMedPub Journals*, 4, 1–15. <https://doi.org/10.3823/748>
- Renvert, S., Lindahl, C., Renvert, H., & Persson, G. R. (2008). Clinical and microbiological analysis of subjects treated with Br?nemark or AstraTech implants: A 7-year follow-up study. *Clinical Oral Implants Research*, 19(4), 342–347. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2007.01476.x>
- Roda, R. P., Bagán, J. V., Bielsa, J. M. S., & Pastor, E. C. (2007). Antibiotic use in dental practice. A review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 12(12), 186–192. <https://doi.org/10.1007/s13205-013-0121-9>Cunningham
- Rudney, J. D., & Staikov, R. K. (2002). Simultaneous measurement of the viability, aggregation, and live and dead adherence of *Streptococcus crista*, *Streptococcus mutans* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human saliva in relation to

- indices of caries, dental plaque and periodontal dise. *Archives of Oral Biology*, 47(5), 347–359. [https://doi.org/10.1016/S0003-9969\(02\)00019-5](https://doi.org/10.1016/S0003-9969(02)00019-5)
- Shi, J., Liu, Y., Wang, Y., Zhang, J., Zhao, S., & Yang, G. (2015). Biological and immunotoxicity evaluation of antimicrobial peptide-loaded coatings using a layer-by-layer process on titanium. *Scientific Reports*, 5(November), 1–15. <https://doi.org/10.1038/srep16336>
- Siqueira, J. F. (2002). Endodontic infections: Concepts, paradigms, and perspectives. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*, 94(3), 281–293. <https://doi.org/10.1067/moe.2002.126163>
- Siqueira, J. F., & Rôçac, I. N. (2009). Critical review in oral biology and Medicine: Diversity of endodontic microbiota revisited. *Journal of Dental Research*, 88(11), 969–981. <https://doi.org/10.1177/0022034509346549>
- Spindler, E. C., Hale, J. D. F., Giddings, T. H., Hancock, R. E. W., & Gill, R. T. (2011). Deciphering the mode of action of the synthetic antimicrobial peptide bac8c. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(4), 1706–1716. <https://doi.org/10.1128/AAC.01053-10>
- Tao, R., Jurevic, R. J., Coulton, K. K., Tsutsui, M. T., Roberts, M. C., Kimball, J. R., ... Dale, B. A. (2005). Salivary Antimicrobial Peptide Expression and Dental Caries Experience in Children. *Antimicrobial Agents and Chemoterapy*, 49(9), 3883–3888. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.9.3883>
- Taylor, J. J. (2014). Protein Biomarkers of Periodontitis in Saliva. *ISRN Inflammation*, 2014(Cvd), 1–18. <https://doi.org/10.1155/2014/593151>
- Teixeira-Salum, T. B., Rodrigues, D. B. R., Gervásio, A. M., Souza, C. J. A., Rodrigues, V., & Loyola, A. M. (2010). Distinct Th1, Th2 and Treg cytokines balance in chronic periapical granulomas and radicular cysts. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 39(3), 250–256. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2009.00863.x>
- Turner, S. R., Love, R. M., & Lyons, K. M. (2004). An in-vitro investigation of the antibacterial effect of nisin in root canals and canal wall radicular dentine. *International Endodontic Journal*, 37(10), 664–671. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2004.00846.x>
- Van Nieuw Amerongen, A., Bolscher, J. G. M., & Veerman, E. C. I. (2004). Salivary proteins: Protective and diagnostic value in cariology? *Caries Research*, 38(3), 247–253. <https://doi.org/10.1159/000077762>
- Ventola, C. L. (2015). The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P & T*:

- A Peer-Reviewed Journal for Formulary Management* (2015), 40(4), 277–283.
<https://doi.org/Article>
- W.V., G., T., B., J.S., K., C.a., R., T., M., & D.T., W. (2009). Saliva as a diagnostic tool for periodontal disease: Current state and future directions. *Periodontology 2000*, 50(1), 52–64. <https://doi.org/10.4103/2468-6360.186487>
- Wang, G., Gao, X., & Lo, E. C. M. (2015). Public perceptions of dental implants: A qualitative study. *Journal of Dentistry*, 43(7), 798–805. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2015.04.012>
- Wang, H., Ai, L., Zhang, Y., Cheng, J., Yu, H., Li, C., ... Lin, L. (2018). The Effects of Antimicrobial Peptide Nal-P-113 on Inhibiting Periodontal Pathogens and Improving Periodontal Status. *BioMed Research International*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/1805793>
- Wang, Y., Fan, Y., Zhou, Z., Tu, H., Ren, Q., Wang, X., ... Zhang, L. (2017). De novo synthetic short antimicrobial peptides against cariogenic bacteria. *Archives of Oral Biology*, 80, 41–50. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2017.03.017>
- Warnke, P. H., Voss, E., Russo, P. A. J., Stephens, S., Kleine, M., Terheyden, H., & Liu, Q. (2013). Antimicrobial Peptide Coating of Dental Implants: Biocompatibility Assessment of Recombinant Human Beta Defensin-2 for Human Cells. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 28(4), 982–988. <https://doi.org/10.11607/jomi.2594>
- Weinbergl, A. (1998). Review and Significance for Oral Applications, 2(4), 399–414.
- Zero, D. T., Zandona, A. F., Vail, M. M., & Spolnik, K. J. (2011). Dental Caries and Pulpal Disease. *Dental Clinics of North America*, 55(1), 29–46. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2010.08.010>